

REC'D 24 APR 2003

Rec'd PCT/PTO 28 SEP 2004

WIPO PCT

PCT/JP03/01917

日本国特許庁

JAPAN PATENT OFFICE

21.02.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 3月29日

出願番号

Application Number:

特願2002-095721

[ST.10/C]:

[JP2002-095721]

出願人

Applicant(s):

クミアイ化学工業株式会社  
独立行政法人農業生物資源研究所

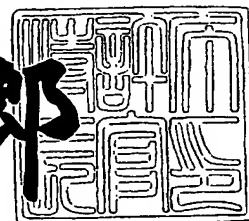
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 4月 1日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3022788

【書類名】 特許願

【整理番号】 P02-0048

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特許出願

【提出日】 平成14年 3月29日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 9/00

【発明の名称】 アセト乳酸シンターゼをコードする遺伝子

【請求項の数】 7

【発明者】

    【住所又は居所】 静岡県磐田郡福田町蛭池 2 7 6 - 1    サンハイツ蛭池C号

    【氏名】 角 康一郎

【発明者】

    【住所又は居所】 静岡県小笠郡菊川町平尾 1 1 4

    【氏名】 清水 力

【発明者】

    【住所又は居所】 静岡県小笠郡菊川町加茂 1 8 0 9

    【氏名】 河合 清

【発明者】

    【住所又は居所】 静岡県掛川市八坂 2 3 8 4 - 4

    【氏名】 永山 孝三

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市吾妻 2 - 1 1 - 8 0 2 - 4 0 4

    【氏名】 福田 篤徳

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市吾妻 2 - 3 - 2 - 7 0 8 - 3 0 5

    【氏名】 田中 喜之

【特許出願人】

【識別番号】 000000169

【氏名又は名称】 クミアイ化学工業株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 501167644

【氏名又は名称】 独立行政法人 農業生物資源研究所

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100118773

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤田 節

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 貞次

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 10,500円

【その他】 国等以外のすべての者の持分の割合 50 / 100

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アセト乳酸シンターゼをコードする遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の（a）又は（b）のタンパク質をコードする遺伝子。

（a）配列番号2，4，6および8のいずれか1つに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

（b）配列番号2，4，6および8のいずれか1つに記載のアミノ酸配列における少なくとも1以上のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、ピリミジニルカルボキシ除草剤に対する抵抗性を有し、アセト乳酸シンターゼ活性を有するタンパク質。

【請求項2】 請求項1記載の遺伝子によりコードされるアセト乳酸シンターゼタンパク質。

【請求項3】 請求項1記載の遺伝子を有する組換えベクター。

【請求項4】 請求項3記載の組換えベクターを有する形質転換体。

【請求項5】 請求項1記載の遺伝子を有し、ピリミジニルカルボキシ除草剤に対する抵抗性を有する植物。

【請求項6】 請求項5記載の植物を、ピリミジニルカルボキシ除草剤存在下で育成することを特徴とする植物育成方法。

【請求項7】 請求項1記載の遺伝子を選択マーカーとして使用し、該遺伝子を有する形質転換細胞を選択する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、分岐鎖アミノ酸生合成経路における律速酵素であるアセト乳酸シンターゼをコードする遺伝子に関する。

【0002】

【従来の技術】

アセト乳酸シンターゼ（以下、「ALS」という。）は、ロイシン、バリン及びイソロイシン等の分岐鎖アミノ酸生合成経路における律速酵素であり、植物の成



長にとって必須な酵素として知られている。ALSは、高等植物全体に渡って広く存在していることが知られており、種々の微生物、例えば酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) 等においても見い出されている。

## 【0003】

大腸菌及びネズミチフス菌には、ALSのイソ酵素が3種存在していることが知られている。これら各々のイソ酵素は、酵素の触媒活性を司る分子量の大きい触媒サブユニットと分岐鎖アミノ酸が結合することによりフィードバック阻害剤として機能する分子量の小さい制御サブユニットとからなるヘテロオリゴマーである (Chipman et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 1385, 401-419, 1998)。触媒サブユニットは、それぞれ *Ilv IH*、*Ilv GM*、*Ilv BN* オペロンに位置している。一方、酵母菌の場合、ALSは、単一の酵素であるが、細菌と同様に触媒サブユニットと制御サブユニットとからなり (Pang et al., *Biochemistry*, 38, 5222-5231, 1999)、触媒蛋白質サブユニットは *ILV2* 座位に位置している。

## 【0004】

一方、植物におけるALSの場合も、上述した微生物と同じように触媒サブユニットと制御サブユニットとからなることが知られている (Hershey et al., *Plant Molecular Biology*. 40, 795-806, 1999)。例えば、双子葉植物のタバコの場合、ALSの触媒サブユニットは、*SuRA* 及び *SuRB* の2つの遺伝子座位によってコードされ (Lee et al., *EMBO J.* 7, 1241-1248, 1988)、トウモロコシの場合、ALSの触媒サブユニットは、*als 1* 及び *als 2* の2つの遺伝子座位にコードされている (Burr et al., *Trends in Genetics* 7, 55-61, 1991; Lawrence et al., *Plant Mol. Biol.* 18, 1185-1187, 1992)。触媒サブユニットをコードする遺伝子に関しては、双子葉植物の場合、タバコだけでなくアラビドプシス (*Arabidopsis*)、ナタネ、ワタ、オナモミ (*Xanthium*)、アマランサス (*Amaranthus*) 及びホウキギ (*Kochia*) について完全に塩基配列が決定されている (Chipman et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 1385, 401-419, 1998 及び再公表特許 W097/08327 参照)。単子葉植物で塩基配列が完全に決定されているのはトウモロコシとイネ (角ら, 日本農薬学会第26回大会講演要旨集, 101頁, 2001) である。

## 【0005】

一方、スルホニルウレア系除草剤、イミダゾリノン系除草剤、トリアゾロピリミジン系除草剤並びにピリミジニルカルボキシ系除草剤（以下、「PC系除草剤」という。）等の除草剤は、このALSを阻害することによって植物の成長を抑制することが知られている（Ray, Plant Physiol. 75, 827-831, 1984; Shaner et al., Plant Physiol. 76, 545-546, 1984; Subramanian et al., Plant Physiol. 96, 310-313, 1991; Shimizu et al., J. Pestic. Sci. 19, 59-67, 1994）。

## 【0006】

これら除草剤に対して抵抗性を有する植物としては、表1及び表2に示すように、ALSをコードする遺伝子において、種を越えて保存されている保存領域中の1個又は2個のアミノ酸置換を引き起こす1個又は2個の塩基置換を有しているものが知られている。

## 【0007】

【表1】

ALS阻害型除草剤抵抗性を与える植物ALSの変異(1)

植物種	変異	対象薬剤	対応するイネALSアミノ酸
<i>Zea mays</i>	Ala90Thr	IM	Ala96Thr
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ala122Val		Ala96Val
<i>Xanthium strumarium</i>	Ala100Thr	IM	Ala96Thr
<i>Beta vulgaris</i>	Ala113Thr	IM/SU	Ala96Thr
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Met124Glu		Met98Glu
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Met124Ile		Met98Ile
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Met124His		Met98His
<i>Lactuca serriola</i>	Pro→His	SU	Pro171His
<i>Kochia scoparia</i>	Pro189Thr	SU	Pro171Thr
<i>Kochia scoparia</i>	Pro189Ser	SU	Pro171Ser
<i>Kochia scoparia</i>	Pro189Arg	SU	Pro171Arg
<i>Kochia scoparia</i>	Pro189Leu	SU	Pro171Leu
<i>Kochia scoparia</i>	Pro189Gln	SU	Pro171Gln
<i>Kochia scoparia</i>	Pro189Ala	SU	Pro171Ala
<i>Brassica napus</i>	Pro173Ser		Pro171Ser
<i>Nicotina tabacum</i>	Pro196Gln	SU	Pro171Gln
<i>Nicotina tabacum</i>	Pro196Ala	SU	Pro171Ala
<i>Nicotina tabacum</i>	Pro196Ser	SU	Pro171Ser
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Pro197Ser	SU	Pro171Ser
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Pro197deletion		Pro171deletion
<i>Beta vulgaris</i>	Pro188Ser	IM/SU	Pro171Ser
<i>Sisymbrium orientale</i>	Pro→Ile		Pro171Ile
<i>Brassica tournefortii</i>	Pro→Ala		Pro171Ala
<i>Scirpus juncooides</i>	Pro→Leu	SU	Pro171Leu
<i>Scirpus juncooides</i>	Pro179Ala	SU	Pro171Ala
<i>Scirpus juncooides</i>	Pro179Gln	SU	Pro171Gln
<i>Scirpus juncooides</i>	Pro179Ser	SU	Pro171Ser
<i>Scirpus juncooides</i>	Pro179Lys	SU	Pro171Lys
<i>Lindernia micrantha</i>	Pro→Gln	SU	Pro171Gln
<i>Lindernia procumbens</i>	Pro→Ser	SU	Pro171Ser
<i>Lindernia dubia</i> subsp.	Pro→Ser	SU	Pro171Ser
<i>Lindernia dubia</i>	Pro→Ala	SU	Pro171Ala
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Arg199Ala		Arg173Ala
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Arg199Glu		Arg173Glu
<i>Xanthium strumarium</i>	Ala183Val		Ala179Val
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Phe206Arg		Phe180Arg

【0008】

【表 2】

ALS阻害型除草剤抵抗性を与える植物ALSの変異 (2)

植物種	変異	対象薬剤	対応するイネALSアミノ酸
<i>Kochia scoparia</i>	Asp260Gly	SU	Asp242Gly
<i>Kochia scoparia</i>	Trp487Arg	SU	Try465Arg
<i>Kochia scoparia</i>	Asn561Ser	SU	Asn539Ser
<i>Kochia scoparia</i>	Trp570Leu		Trp548Leu
<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Trp563Cys	SU ?	Try548Cys
<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Trp563Ser	SU ?	Try548Ser
<i>Brassica napus</i>	Trp557Leu		Try548Leu
<i>Zea mays</i> L.	Trp552Leu	IM	Try548Leu
<i>Nicotina tabacum</i> L.	Trp537Leu	SU	Try548Leu
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Trp574Leu		Try548Leu
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Trp574Ser		Try548Ser
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Trp574deletion		Try548deletion
<i>Xanthium strumarium</i>	Trp552Leu	IM	Try548Leu
<i>Oryza sativa</i> .	Trp548Leu	PC	Try548Leu
<i>Amaranthus</i> sp.	Trp569Leu		Try548Leu
<i>Amaransus rudis</i>	Trp569Leu	IMI	Try548Leu
<i>Sisymbrium orientale</i>	Trp→Leu		Try548Leu
<i>Zea mays</i>	Ser621Asp	IM	Ser627Asp
<i>Zea mays</i>	Ser621Asn	IM	Ser627Asn
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ser653Asn	IM	Ser627Asn
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ser653Thr		Ser627Thr
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ser653Phe		Ser627Phe
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ser653delition		Ser627deletion
<i>Oryza sativa</i>	Ser627Ile	PC	Ser627Ile
<i>Kochia scoparia</i>	Val276Glu	SU	

【0009】

例えば、スルホニルウレア系除草剤に対して特異的な抵抗性を有するALSをコードするもの (Kathleen et al., EMBO J. 7,1241-1248, 1988; Mourad et al., Planta, 188, 491-497, 1992; Guttieri et al., Weed Sci. 43,175-178, 1995; Bernasconi et al., J. Biol. Chem. 270, 17381-17385, 1995及び特開昭63-71184号公報参照)、イミダゾリノン系除草剤に対して特異的な抵抗性を有するALSをコードするもの (Mourad et al., Planta, 188, 491-497, 1992; Lee et al., FEBS Lett. 452,341-345, 1999及び特開平5-227964号公報参照)、スルホニルウレア系除草剤とイミダゾリノン系除草剤の両方に対して抵抗性を有するALSをコードするもの (Kathleen et al., EMBO J. 7,1241-1248, 1988; Bernasconi et al., J. Biol. Chem. 270, 17381-17385, 1995; Hattori et al., Mol. Gen. Genet. 246,419-425, 1995; Alison et al., Plant Physiol. 111, 1353, 1996;

Rajasekarau et al., Plant Sci. 119, 115-124, 1996、特開昭63-71184号公報、特開平4-311392号公報及び Bernasconi et al., US Patent 5633437, 1997参照)、或いはPC系除草剤に高度な抵抗性を有するALSをコードするもの(角ら、日本農薬学会第26回大会講演要旨集, 101頁, 2001)が挙げられる。スルホニルウレア系除草剤に特異的に抵抗性を示すALSを有する個体とイミダゾリノン系除草剤に特異的に抵抗性を示すALSを有する個体とを掛け合わせて、両方に抵抗性を示す植物体を作る試みもなされている(Mourad et al., Mol. Gen. Genet, 243, 178-184, 1994)。さらに、ALSをコードする遺伝子を入為的に除草剤抵抗性遺伝子へ変えることも行われており(Ott et al., J. Mol. Biol. 263, 359-368, 1996、特開昭63-71184号公報、特開平5-227964号公報、特表平11-504213号公報参照)、1個のアミノ酸の欠失がスルホニルウレア系除草剤とイミダゾリノン系除草剤の両方に抵抗性を示すことが明かにされている(特開平5-227964号公報参照)。

#### 【0010】

上述のように除草剤に対する抵抗性を有するALS及びALSをコードする遺伝子について精力的に研究されてきた経緯があるが、PC系除草剤抵抗性を指標とし、PC系除草剤に対して特異的な抵抗性を有する変異ALS遺伝子については報告例が少なく、また、PC系除草剤及びその他の除草剤に対する抵抗性の検討に関しても報告例は少なかった。

#### 【0011】

##### 【発明が解決しようとする課題】

そこで、本発明は、PC系除草剤或いはスルホニルウレア系除草剤に対して高度な抵抗性を示すALSタンパク質をコードする遺伝子、該遺伝子によりコードされるALSタンパク質、該遺伝子を有する組換えベクター、該組換えベクターを有する形質転換体、該遺伝子を有する植物、該植物の育成方法及び、該遺伝子を選択マーカーとして使用する形質転換細胞を選択する方法を提供することを目的とする。

#### 【0012】

##### 【課題を解決するための手段】

上述した目的を達成するため、本発明者が鋭意検討した結果、野生型ALSにおける所定のアミノ酸残基を、所定のアミノ酸で置換してなる変異ALSがPC系除草剤に対して極めて高度な抵抗性を示すことを見出し本発明を完成するに至った。

#### 【0013】

(1) すなわち、本発明は、以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子である。

(a) 配列番号2, 4, 6および8のいずれか1つに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号2, 4, 6および8のいずれか1つに記載のアミノ酸配列における少なくとも1以上のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、ピリミジニルカルボキシ除草剤に対する抵抗性を有し、アセト乳酸シンターゼ活性を有するタンパク質。

#### 【0014】

(2) また、本発明は、(1) 記載の遺伝子によりコードされるアセト乳酸シンターゼタンパク質である。

(3) さらに、本発明は、(1) 記載の遺伝子を有する組換えベクターである。

(4) さらにまた、本発明は、(3) 記載の組換えベクターを有する形質転換体である。

#### 【0015】

(5) さらにまた、本発明は、(1) 記載の遺伝子を有し、ピリミジニルカルボキシ除草剤に対する抵抗性を有する植物である。

(6) さらにまた、本発明は、(5) 記載の植物を、ピリミジニルカルボキシ除草剤存在下で育成することを特徴とする植物育成方法である。

(7) さらにまた、本発明は、(1) 記載の遺伝子を選択マーカーとして使用し、該遺伝子を有する形質転換細胞を選択する方法である。

#### 【0016】

#### 【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のアセト乳酸シンターゼをコードする遺伝子（以下、「変異型ALS遺伝子」という）は、野生型アセト乳酸シンターゼタンパク質（以下、「野生型ALSタンパク質」という）と異なるアミノ酸配列を有するアセト乳酸シンターゼタンパク質（以下、「変異型ALSタンパク質」という）をコードするものである。変異型ALSタンパク質は、イネで発現している野生型ALSタンパク質における所定の部位を変異させることによって得ることができる。本発明の変異型ALSタンパク質は、配列番号 2, 4, 6 及び 8 のいずれかのアミノ酸配列を含んでいる。

【 0 0 1 7 】

配列番号 2 のアミノ酸配列では、野生型ALSタンパク質のアミノ酸配列における 171 番目のプロリンがヒスチジンに置換されるとともに、野生型ALSタンパク質のアミノ酸配列における 172 番目のアルギニンがセリンに置換されている。配列番号 2 のアミノ酸配列を含む変異型ALSタンパク質を、「P171H/R172S変異型ALSタンパク質」又は「P171H/R172S変異型」と呼ぶ。

【 0 0 1 8 】

配列番号 4 のアミノ酸配列では、野生型ALSタンパク質のアミノ酸配列における 171 番目のプロリンがヒスチジンに置換されるとともに、野生型ALSタンパク質のアミノ酸配列における 548 番目のトリプトファンがロイシンに置換されている。配列番号 4 のアミノ酸配列を含む変異型ALSタンパク質を、「P171H/W548L変異型ALSタンパク質」又は「P171H/W548L変異型」と呼ぶ。

【 0 0 1 9 】

配列番号 6 のアミノ酸配列では、野生型ALSタンパク質のアミノ酸配列における 171 番目のプロリンがヒスチジンに置換されるとともに、野生型ALSタンパク質のアミノ酸配列における 627 番目のセリンがイソロイシンに置換されている。配列番号 6 のアミノ酸配列を含む変異型ALSタンパク質を、「P171H/S627I変異型ALSタンパク質」又は「P171H/S627I変異型」と呼ぶ。

【 0 0 2 0 】

配列番号 8 のアミノ酸配列では、野生型ALSタンパク質のアミノ酸配列における 171 番目のプロリンがヒスチジンに置換されるとともに、野生型ALSタンパク質のアミノ酸配列における 548 番目のトリプトファンがロイシン置換されるととも

に、野生型ALSタンパク質のアミノ酸配列における627番目のセリンがイソロイシンに置換されている。配列番号8のアミノ酸配列を含む変異型ALSタンパク質を、「P171H/W548L/S627I変異型ALSタンパク質」又は「P171H/W548L/S627I変異型」と呼ぶ。

## 【0021】

図1A及び図1Bにこれら4種類の変異型ALSタンパク質のアミノ酸配列と野生型ALSタンパク質のアミノ酸配列とを比較した結果を示す。なお、図1A及び図1Bにおいて、一列目のアミノ酸配列は野生型ALSタンパク質を示しており、二列目のアミノ酸配列はP171H/R172S変異型ALSタンパク質を示しており、三列目のアミノ酸配列はP171H/W548L変異型ALSタンパク質を示しており、四列目のアミノ酸配列はP171H/S627I変異型ALSタンパク質を示しており、五列目のアミノ酸配列はP171H/W548L/S627I変異型ALSタンパク質を示している。

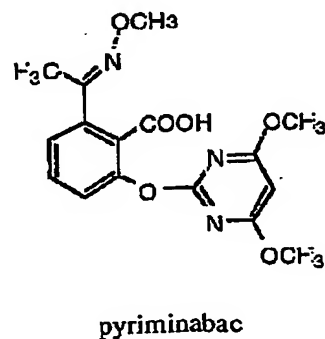
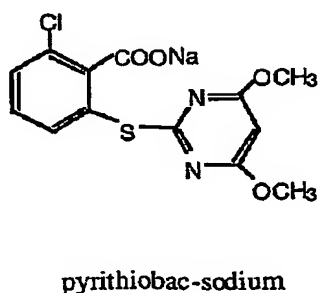
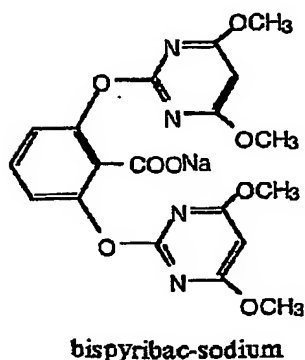
## 【0022】

これら変異型ALSタンパク質は、野生型ALSタンパク質と比較して、PC系除草剤に対する優れた抵抗性を有するばかりでなく、スルホニルウレア系除草剤及びイミダゾリノン系除草剤に対しても抵抗性を有する。このことは、例えば、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子をサブクローニングしたpGEX 2Tで形質転換した大腸菌等において、発現した変異型ALSタンパク質の除草剤感受性を調べることにより判断することができる。

ここで、PC系除草剤としては、化1に示すように、bispyribac-sodium, pyrihiobac-sodium, pyriminobacを例示することができる。

## 【0023】

## 【化1】



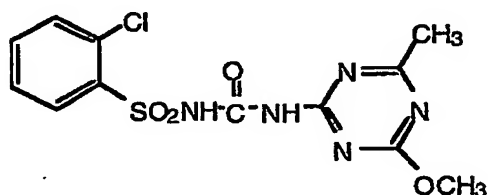


【0024】

スルホニルウレア系除草剤としては、化2に示すように、chlorsulfuronを例示することができる。

【0025】

【化2】



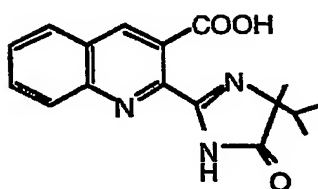
chlorsulfuron

【0026】

イミダゾリノン系除草剤としては、化3に示すように、imazaquinを例示することができる。

【0027】

【化3】



imazaquin

【0028】

特に、P171H/R172S変異型ALSタンパク質は、P171H或いはR172Sを単独で有する変異型ALSタンパク質と比較して所定の除草剤に対して優れた抵抗性を示すだけでなく、P171H或いはR172Sを単独で有する変異型ALSタンパク質それぞれの抵抗性から予測される抵抗性よりも優れた抵抗性を示す。なお、R172Sを単独で有する変異型ALSタンパク質は、いかなる除草剤に対しても抵抗性を示すものではなく、R172S変異はサイレント変異である。換言すれば、P171H/R172S変異型ALSタンパク質は、単独ではサイレント変異であるR172S変異が、P171H変異型ALSタンパク質における抵抗性を向上させている。

## 【0029】

また、P171H/W548L変異型タンパク質は、P171H或いはW548Lを単独で有する変異型ALSタンパク質と比較して所定の除草剤に対して優れた抵抗性を示すだけでなく、P171H或いはW548Lを単独で有する変異型ALSタンパク質それぞれの抵抗性から予測される抵抗性よりも優れた抵抗性を示す。換言すれば、P171H/W548L変異型タンパク質は、P171H変異型タンパク質及びW548L変異型タンパク質の両方の抵抗性から予測される相加効果の抵抗性を大幅に上回る抵抗性を示す。

## 【0030】

さらに、特に、P171H/S627I変異型タンパク質は、P171H或いはS627Iを単独で有する変異型ALSタンパク質と比較して所定の除草剤に対して優れた抵抗性を示すだけでなく、P171H或いはS627Iを単独で有する変異型ALSタンパク質それぞれの抵抗性から予測される抵抗性よりも優れた抵抗性を示す。換言すれば、P171H/S627I変異型タンパク質は、P171H変異型タンパク質及びS627I変異型タンパク質の両方の抵抗性から予測される相加効果の抵抗性を大幅に上回る抵抗性を示す。

さらにまた、特に、P171H/W548L/S627I変異型タンパク質は、P171H、W548L或いはS627Iを単独で有する変異型ALSタンパク質と比較して所定の除草剤に対して優れた抵抗性を示す。

## 【0031】

なお、本発明の変異型ALSタンパク質は、ピリミジニルカルボキシ除草剤に対する抵抗性を有し、且つ、アセト乳酸シンターゼ活性を有するアミノ酸配列であれば、配列番号2、4、6及び8のいずれかのアミノ酸配列において、少なくとも1以上のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなるものであってもよい。ここで、「1以上のアミノ酸」とは、1～30個のアミノ酸であることが好ましく、1個～20個のアミノ酸であることがより好ましく、1～10個のアミノ酸であることが更に好ましい。

## 【0032】

特に、配列番号2のアミノ酸配列においては、「少なくとも1以上のアミノ酸」として171番目及び172番目のアミノ酸以外のアミノ酸であることが好ましい。配列番号4のアミノ酸配列においては、「少なくとも1以上のアミノ酸」として

171番目及び548番目のアミノ酸以外のアミノ酸であることが好ましい。配列番号6のアミノ酸配列においては、「少なくとも1以上のアミノ酸」として171番目及び627番目のアミノ酸以外のアミノ酸であることが好ましい。配列番号8のアミノ酸配列においては、「少なくとも1以上のアミノ酸」として171番目、627番目及び548番目のアミノ酸以外のアミノ酸であることが好ましい。

#### 【0033】

ところで、本発明の変異型ALS遺伝子は、上述したような変異型ALSタンパク質をコードする塩基配列を有するものであれば特に限定されないが、例えば、配列番号1、3、5及び7のいずれかの塩基配列を挙げることができる。配列番号1の塩基配列は配列番号2のアミノ酸配列をコードし、配列番号3の塩基配列は配列番号4のアミノ酸配列をコードし、配列番号5の塩基配列は配列番号6のアミノ酸配列をコードし、配列番号7の塩基配列は配列番号8のアミノ酸配列をコードしている。変異型ALS遺伝子は、配列番号1、3、5及び7のいずれかの塩基配列において、所定のアミノ酸をコードするコドンに縮重コドンにより置換した塩基配列であっても良い。

#### 【0034】

図2A、図2B、図2C及び図2Dにこれら4種類の変異型ALSタンパク質をコードする塩基配列と野生型ALSタンパク質をコードする塩基配列とを比較した結果を示す。なお、図2A、図2B、図2C及び図2Dにおいて、一列目の塩基配列は野生型ALSタンパク質を示しており、二列目の塩基配列はP171H/R172S変異型ALSタンパク質を示しており、三列目の塩基配列はP171H/W548L変異型ALSタンパク質を示しており、四列目の塩基配列はP171H/S627I変異型ALSタンパク質を示しており、五列目の塩基配列はP171H/W548L/S627I変異型ALSタンパク質を示している。

#### 【0035】

また、本発明の変異型ALS遺伝子は、配列番号1、3、5及び7のいずれかの塩基配列に相補的な塩基配列に対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズでき、且つ、アセト乳酸シンターゼ活性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるものであってもよい。ストリンジェントな条件とは、いわゆる

特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。ストリンジェントな条件下としては、例えば、相同性が高いDNA同士（例えば50%以上の相同性を有するDNA同士）がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件を挙げることができる。具体的に、ストリンジェントな条件としては、通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

#### 【0036】

これら変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子は、日本型イネ品種である金南風のゲノムDNAに存在する野生型ALSタンパク質をコードする遺伝子に対して、上述したような変異を導入することによって得ることができる。変異を導入する手法としては、公知の手法を使用することができ、例えば、部位特異的変異導入法を用いることができる。部位特異的変異導入法は、市販のキット、例えばMutan-K（宝酒造株式会社製）、GeneEditor（プロメガ社製）、ExSite（ストラタジーン社製）等を使用して行うことができる。

#### 【0037】

また、変異ALSタンパク質をコードする遺伝子は、PC系除草剤感受性の野生株培養細胞をPC系除草剤の存在下で培養し、その後、出現したPC系除草剤に対する抵抗性を示す変異株培養細胞から得ることができる。そして見いだされた変異をもとにしてPCR法及びSPR（self polymerase reaction）法により、新たな変異の組み合わせを持つALSタンパク質をコードする遺伝子を、酵素を使って合成することができる。

#### 【0038】

具体的には、まず、PC系除草剤抵抗性の変異型培養細胞からmRNAを調製し、cDNAを合成後、λgt11ファージのcDNAライブラリーを作出する。これを、野生型ALSタンパク質をコードする遺伝子の一部を含んでいる核酸プローブを用いてスクリーニングし、得られる陽性クローンのインサートDNAをpBluescript II SK+にサブクローニングし塩基配列を決定する。変異が認められたcDNAインサートにつ

いては、インサートDNAを保持するpBluescript II SK+を鋳型として、野性型イネALS遺伝子を元に設計したプライマーを使い、PCR及とSPR法で変異を含む断片を合成する。一方、PC系除草剤抵抗性のイネ培養細胞からゲノムDNAを調製すると共にイネALS遺伝子を元に各種プライマーを設計する。そしてプライマーウオーキングによって、調製したゲノムDNAに存在するALS遺伝子のシーケンスを決定して変異部位を見つけ出す。変異が見い出された場合に、その変異を含む断片をPCR法及びSPR法で合成する。pBluescript II SK+へクローニングした変異型ALS cDNAから合成した変異を含む断片を含めて、これらの変異を含む断片をpGEX 2Tへサブクローニングし、このベクターで大腸菌を形質転換する。

## 【 0 0 3 9 】

その結果、配列番号2、4、6及び8に示すアミノ酸配列をコードするインサートDNAを有するクローンを選択することによって、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子を得ることができる。なお、上述のようにして得られた、配列番号2に示すアミノ酸配列を含む変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子をpGEX 2Tに組み込んだプラスミドはRice Mutant ALS cDNA 1(FERM BP-7944)として、配列番号4に示すアミノ酸配列を含む変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子をpGEX 2Tに組み込んだプラスミドはRice Mutant ALS cDNA 2(FERM BP-7945)として、配列番号6に示すアミノ酸配列を含む変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子をpGEX 2Tに組み込んだプラスミドはRice Mutant ALS cDNA 3(FERM BP-7946)として、配列番号8に示すアミノ酸配列を含む変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子をpGEX 2Tに組み込んだプラスミドはRice Mutant ALS cDNA 4(FERM BP-7947)として、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に、平成14年3月8日付けでブタペスト条約に基づき国際寄託されている。

## 【 0 0 4 0 】

一方、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子を、標的とする植物に形質転換することによって、当該植物に対してPC系除草剤等の多種の除草剤に対して抵抗性を与えることができる。植物に形質転換する手法としては、公知の手法を使用することができる。例えば、アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*)

s) を用いて外来遺伝子を標的植物細胞に導入する手法を例示することができる。

#### 【 0 0 4 1 】

具体的には、アグロバクテリウムのTiプラスミドのT-DNA配列を含んでいるバイナリーベクターに変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子を挿入する。このTiプラスミドを大腸菌等に形質転換する。次に、大腸菌等で増殖させた変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子を保持するバイナリーベクターを、ヘルパープラスミドを含んでいるアグロバクテリウム菌に形質転換する。そして、このアグロバクテリウム菌を、標的とする植物に感染させた後、形質転換植物を同定する。同定された形質転換植物が培養細胞の場合には、公知の手法により、その植物細胞を完全な植物に再生させることができる。

#### 【 0 0 4 2 】

また、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子を標的とする植物に形質転換する場合、公知の手法を用いて直接的に植物体に導入してもよい。さらに、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子を有する発現ベクターを形質転換する方法としては、ポリエチレングリコール法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法等を使用することができる。

#### 【 0 0 4 3 】

一方、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子は、単子葉植物及び双子葉植物等のいかなる種類の植物に形質転換してもよい。変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子を形質転換する対象の作物としては、例えば、イネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、大豆、棉、アブラナ、サトウダイコン及びタパコ等を挙げることができる。さらに、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子を導入することによって、芝草や樹木等を形質転換してもよい。

いずれの場合であっても、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子を植物に形質転換することによって、当該植物に対して、PC系除草剤、スルホニルウレア系除草剤及びイミダゾリノン系除草剤に対する抵抗性を付与することができる。

#### 【 0 0 4 4 】

ところで、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子は、植物形質転換実験に

おける選択性マーカーとしても使用することができる。例えば、目的遺伝子を用いて植物細胞を形質転換する場合、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子と目的遺伝子とを有するベクターを植物細胞内に導入した後、当該植物細胞をPC系除草剤等の除草剤の存在下で培養する。その結果、除草剤の存在下で生存する植物細胞には、変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子と共に目的遺伝子が導入されたことが判る。また、目的遺伝子及び変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子が植物細胞の染色体に組み込まれたかどうかは、その植物の表現型を観察した後、ゲノムサザンハイブリダイゼーション或いはPCRによって、これら遺伝子のゲノム上の存在を調べることで確認することができる。

## 【0045】

## 【実施例】

以下、本発明を、実施例を用いて更に詳細に説明する。ただし、本発明の技術範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

## 【実施例1】 PC除草剤抵抗性のイネ（金南風）培養細胞の作出

イネの種子（品種；金南風、学名：Oryza sativa var. Kinmaze）の籾を除いた後、当該種子を70%のエタノール中に5分間浸漬し、その後、約5%のアンチホルミン中に20分間浸漬し、その後、滅菌蒸留水で数回洗浄した。次に、この種子を表3に示す組成の培地上で静置培養した。

## 【0046】

## 【表3】

無機塩（ムラシゲ・スケーグ培地用混合塩類）	1 袋
チアミン・HCl (0.1 g/l)	1 ml
ニコチン酸 (0.5 g/l)	1 ml
ピリドキシン・HCl (0.5 g/l)	1 ml
グリシン (2 g/l)	1 ml
myo-イノシトール (50 g/l)	2 ml
2,4-D (200 ppm)	10 ml
ショ糖	30 g
ゲルライト	3 g

蒸留水で 1000 ml にして、pH を 5.7 に合わせる

## 【 0 0 4 7 】

なお、上記培地組成中、2,4-Dは合成オーキシシンである。培地を作製する際には、先ず、上記培地組成を1リッターのピーカーに入れ、蒸留水で1000mlにする。次に、これをpH5.7に調製し、3gのゲルライトを添加する。次に、電子レンジを用いて加熱してゲルライトを解かした状態とし、分注機を用いて30mlずつ培養フラスコに分注する。次に、培養フラスコに3重のアルミ箔をかぶせ、オートクレーブ装置内で121℃、15～20分間加熱滅菌する。その後、室温にまで冷却することによって、上記種子を静置培養するための培地を作製した。

## 【 0 0 4 8 】

続いて、この培地上で誘導されたカルスから胚乳の部分を除き継代培養を行った。そして、得られたカルスの一部を、PC系除草剤の1つあるbispyribac-sodiumを1μM添加した液体培地（表3の培地組成と同様であり、ゲルライトを添加しないもの）中でおよそ2週間に1回継代しながら培養を行った。その結果、2週間～6週間程度で培養細胞が枯死し始め、約2ヵ月後でほとんどが枯死して茶色に変色している培養細胞集団の中に、変色が無く細胞分裂を行っていると考えられる細胞塊が複数個得られた。これら細胞塊を単離し、培養を行った結果、2μMのbispyribac-sodium存在下でも増殖する複数の細胞株を得ることができた。得られた細胞株をそれぞれRb系統、Sr系統、Ga系統及びVg系統と命名した。

## 【 0 0 4 9 】

その後、得られた複数の細胞株をbispyribac-sodiumの添加濃度を順次上げて培養した結果、100μMのbispyribac-sodium共存下でも増殖できる細胞株が得られた。このbispyribac-sodium抵抗性培養細胞（以下、抵抗性変異株）を1～10μMのbispyribac-sodiumを添加したMS-2,4-D固体培地で継代培養した。継代培養した抵抗性変異株の一部を採取し、bispyribac-sodium無添加のMS-2,4-D液体培地に添加して、8日～10日間のサイクルで懸濁培養した。

## 【 0 0 5 0 】

そして、この抵抗性変異株約1.5g（湿重量）を、MS-2,4-D液体培地50mlと所定の濃度のbispyribac-sodiumとを入れておいた200mlの三角フラスコに移植し、



約27℃で所定期間培養した。経時的にカルスの湿重量を測定し、移植した抵抗性変異株の湿重量を基準にして相対的な増殖量を求めた。なお、試験は、bispyribac-sodium濃度を変化させたものを3連で行い、標準誤差 (standard error) を算出した。抵抗性変異株におけるbispyribac-sodium濃度変化と8或いは12日目の相対重量との関係を図3～6に示す。また対照として、金南風の野生株を用いて同様な実験を行い、bispyribac-sodium濃度と8日目の相対重量との関係を測定した結果を図7に示す。

#### 【0051】

図7から判るように、野生株では、1 nMのbispyribac-sodium添加区で増殖阻害されなかったが、10 nM以上のbispyribac-sodium添加区で増殖阻害されていることが判る。一方、図3～6から判るように、抵抗性変異株 (Rb系統、Sr系統、Ga系統及びVg系統) では、Vg系統以外は10  $\mu$ Mのbispyribac-sodium添加区においてもほとんど増殖に影響を受けていないことが判る。Vg系統であっても、野生株と比較すると、bispyribac-sodiumの増殖に対する影響が小さいことが判る。

#### 【0052】

一方、bispyribac-sodiumに代えてchlorsulfuronを用いた場合も、上述したように野生株及び抵抗性変異株の増殖率を測定した。野生株におけるchlorsulfuron濃度変化と9日目の相対重量との関係を図8に示す。また、抵抗性変異株、すなわち、Rb系統、Sr系統、Ga系統及びVg系統におけるchlorsulfuron濃度変化と8或いは10日目の相対重量との関係を図9～12に示す。

#### 【0053】

図8から判るように、野生株では、1 nMのchlorsulfuron添加で増殖阻害を受けており、bispyribac-sodiumの場合よりも高い感受性を示した。一方、図9～12から判るように、Rb系統、Sr系統、Ga系統及びVg系統では、それぞれ感受性は異なるが、chlorsulfuron添加による増殖阻害の影響が小さく、chlorsulfuronに対する抵抗性を示した。なお、bispyribac-sodium及びchlorsulfuronに対する感受性は、野生株及び抵抗性変異株において、培養時間が長くても共に大きく変化することはなかった。また、増殖速度は、抵抗性変異株及び野生株において、ともにほぼ同じであった。

これらの結果から、抵抗性変異株は、bispyribac-sodiumに対して高い抵抗性を有するものであることが明らかとなった。また、抵抗性変異株は、野生株と比較してchlorsulfuronに対する抵抗性が向上していることも明らかとなった。

## 【 0 0 5 4 】

## 【実施例 2】抵抗性変異株から部分精製したALSタンパク質の薬剤感受性

本例では、実施例 1 で得られた抵抗性変異株（Ga系統を除く、Rb系統、Sr系統及びVg系統）から変異型ALSタンパク質を部分精製し、得られた変異型ALSタンパク質における薬剤感受性を検討した。変異型ALSタンパク質は以下のようにして部分精製した。

## 【 0 0 5 5 】

まず、表 3 のうちゲルライトを除いた組成で液体培養法（bispyribac-sodium 無添加）により抵抗性変異株を200 g以上調製した。次に、これらの約150 gを組織重量の3倍量の緩衝液-1（20 % (v/v) のグリセロール、0.5 mMのチアミンピロリン酸（TPP）、10  $\mu$ Mのフラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）、0.5 mMのMgCl<sub>2</sub>、組織重量の1/10量のポリビニルポリピロリドンを含む100 mMのリン酸カリウム緩衝液pH 7.5）でヒスコトロンを用いてホモジナイズした。ホモジネートをナイロンガーゼでろ過した後、15000×gで20分間遠心した。遠心上澄に、50 %飽和となるように硫酸アンモニウムを添加し、氷中に約1時間放置した。これを再度、15000×gで20分間遠心し、その沈澱画分を約30 mlの緩衝液-2（20 % (v/v) のグリセロール、0.5 mMのTPP、0.5 mMのMgCl<sub>2</sub>を含む10 mMのトリス塩酸緩衝液緩衝液pH 7.5）に溶解した。これを再度、15000×gで20分間遠心し、その上澄画分をセファデックスG-25（アマシャム バイオサイエンス社製）にアプライして素通り画分を約40 ml採取した。そして、採取した液を「粗酵素液」とした。

## 【 0 0 5 6 】

次に、粗酵素液のタンパク質の濃度を、Bio-Rad Protein Assayのマニュアルに従ってBradford法で測定した。その後、粗酵素液をワットマンフィルター（ワットマン社製）でろ過し、タンパク質量として適正な量の粗酵素液（10～15 ml）をFPLC装置（アマシャム バイオサイエンス社製）を使用して、3本連結したHiTrap Q（アマシャム バイオサイエンス社製）にアプライした。HiTrap Qを用い

てタンパク質成分を吸着させた後、ベッドボリユームの3～5倍量の緩衝液-2で非吸着画分を流し出した。その後、吸着したタンパク質成分を、ベッドボリユームの10倍量 (150 ml) の溶出液を用いて溶出した。ここで、溶出液は、0～0.4 Mの直線濃度勾配で緩衝液-2にKClを溶解させたものである。タンパク質成分を溶出した溶出液は、複数の分取用試験管に5 mlずつ分取した。なお、溶出したタンパク質成分に含まれるALSタンパク質を安定化するために、20 mMのピルビン酸ナトリウムを含む緩衝液-2 (0.5 ml) を事前に分取用試験管の中へ添加しておいた。

## 【 0 0 5 7 】

次に、複数の分取用試験管に分取された溶出画分に含まれる変異型ALSタンパク質に由来するALS活性を、以下のように測定した。測定反応に使用する反応溶液は、20 mMのピルビン酸ナトリウム、0.5 mMのTPP、0.5 mMの $MgCl_2$ 、 $10\mu M$ のFAD及び20 mMのリン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)からなる溶液に、測定対象の溶出画分を混合したものである。この反応溶液を1 ml使用した。測定反応は、測定対象の溶出画分を添加した後、30℃で40分～60分間行った。また、測定反応は、0.1 mlの6 N硫酸 (あるいは0.25 Nの水酸化ナトリウム) を添加することにより停止させた。

## 【 0 0 5 8 】

次に、反応が終了した反応溶液を60℃で10分間インキュベートした。これにより、反応溶液中に含まれるアセト乳酸をアセトインに変化させた。

次に、反応溶液中に含まれるアセトインを定量するため、0.5 % (w/v) のクレアチン1 mlと2.5 Nの水酸化ナトリウムに溶かした5 % (w/v) の $\alpha$ -ナフトール1 mlとを添加し、37℃で10分間インキュベートした。その後、反応溶液における吸光度525 nmを比色することでアセトインを定量し、ALS活性を評価した。なお、反応溶液中には、少量のピルビン酸ナトリウムが含まれるため、反応0時間をコントロールとした。

## 【 0 0 5 9 】

その結果、OD525 nmにおける吸光度が反応溶液0.2 ml当たりで約7という高い値となった。しかしながら、上述した測定反応を水酸化ナトリウムで停止させ、ALS活性以外によるアセトイン生成活性を調べた結果、この見掛け上のALS活性の

80%近くが変異型ALSタンパク質以外の直接的なアセトイン生成活性であることが判った。そこで、変異型ALSタンパク質と変異型ALSタンパク質以外のアセトイン生成活性を、陰イオン交換樹脂を使用したFPLCで分離した。抵抗性変異株としてSr系統を用いた場合の結果を図13に示す。図13に示すように、3つの活性ピークが検出された。

#### 【0060】

これら3つの活性ピークのうち、どちらに変異型ALSタンパク質が含まれているのを判定するために、各ピークのアセトイン生成活性を調べた。その結果、変異型ALSタンパク質は、初めに溶出したピークで示される画分に含まれていることがわかった。

#### 【0061】

そして、変異型ALSタンパク質を含む酵素溶液を用いて、当該変異型ALSタンパク質のbispyribac-sodium、chlorsulfuron及びimazaquinに対する感受性を調べた。各除草剤に対する感受性は、酵素溶液を添加する前に除草剤を所定の濃度となるように反応液中に添加した以外は、上述した測定反応と同様にしてALS活性を測定することによって評価した。また、比較のために、野生型ALSタンパク質を同様にして分離精製し（図14）、実験に供した。なお、bispyribac-sodiumは水溶液とし、chlorsulfuron及びimazaquinはアセトン溶液とした。アセトン溶液は最終濃度1%とした。

#### 【0062】

ALS活性阻害率とbispyribac-sodium濃度との関係を図15に示す。ALS活性阻害率とchlorsulfuron濃度との関係を図16に示す。ALS活性阻害率とimazaquin濃度との関係を図17に示す。なお、これら図15～図17において、野生型ALSタンパク質を破線で示し、Sr系統の変異型ALSタンパク質は二点破線で示し、Rb系統の変異型ALSタンパク質は実線で示し、Vg系統の変異型ALSタンパク質は一点破線で示している。

また、上述した実験から、ALS活性を50%阻害する除草剤濃度（I50値）をプロビット法に準じて算出し、変異ALSタンパク質におけるI50値と野生型ALSタンパク質におけるI50値との比を算出した。結果を表4に示す。

## 【 0 0 6 3 】

【表 4】

化合物	I <sub>50</sub> (nM)			
	野生型	Vg	Sr	Rb
Bispyribac-sodium	5.63	97.2	421	247000
Chlorsulfuron	17.3	495	92.8	32000
Imazaquin	1480	44100	16700	609000

## 【 0 0 6 4 】

さらに、表 4 の結果から、各除草剤について抵抗性変異株の I<sub>50</sub> 値を野生株の I<sub>50</sub> 値で除算し、RS 値を算出した結果を表 5 に示す。

## 【 0 0 6 5 】

【表 5】

化合物	RS 比		
	Vg	Sr	Rb
Bispyribac-sodium	17.3	74.80	43900
Chlorsulfuron	28.6	5.36	1850
Imazaquin	29.8	11.30	411

## 【 0 0 6 6 】

これら図 1 5 ～図 1 7、表 4 及び表 5 に示すように、変異型 ALS タンパク質は、野生型 ALS タンパク質と比較して除草剤存在下でも比較的高い ALS 活性を示した。特に、Rb 系統及び Sr 系統由来の変異型 ALS タンパク質では、それぞれ bispyribac-sodium に対する感受性が他の除草剤に対する感受性と比較して顕著に優れていることが判った。すなわち、これら Rb 系統及び Sr 系統は、特に bispyribac-sodium に対する抵抗性に優れたものであることが判った。

## 【 0 0 6 7 】

## 【実施例 3】野生型及び変異型 ALS 遺伝子のクローニング

本例では、野生株から野生型 ALS タンパク質をコードする遺伝子（野生型 ALS 遺

伝子) をクローニングするとともに、抵抗性変異株から変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子(変異型ALS遺伝子) をクローニングした。

野生型ALS遺伝子及び変異型ALS遺伝子をクローニングする際に使用するプローブを以下のようにして調製した。本例においてプローブとしては、トウモロコシのALS遺伝子と高い相同性を示したイネ(日本晴)由来部分cDNAを使用した。

#### 【0068】

(1) トウモロコシのALS遺伝子と高い相同性を示したイネ(日本晴)由来部分cDNAの塩基配列の決定

社団法人農林水産先端技術産業振興センター及び独立行政法人農業生物資源研究所が行っているイネゲノムプロジェクトの一環でイネ(日本晴)のcDNAの部分塩基配列の決定が行われており、cDNAの部分塩基配列データベースが構築されている。このデータベースに含まれる約350 bpの塩基配列として既に知られているcDNAクローン(アクセッション番号: C72411) がトウモロコシにおけるALS遺伝子と高い相同性を示した。なお、トウモロコシにおけるALS遺伝子は完全に塩基配列が決定されている。

#### 【0069】

そして、このcDNAクローン(アクセッション番号: C72411) を農業生物資源研究所から入手し、以下のように塩基配列を決定した。なお、このcDNAクローンは、ALSホモログ遺伝子がpBluescript II SK+中に挿入されており、大腸菌内で自律複製を行うことができる形であった。

#### 【0070】

まず、このALSホモログ保持プラスミドベクターを大腸菌(DH5 $\alpha$ )へ形質転換した。プレートより得られた白色のコロニーを液体培養し、菌体より常法に従いプラスミドを抽出した。インサートDNAはプラスミドベクター中のマルチクローニングサイトの制限酵素、Sal IとNot Iの間に挿入されていたのでこの2つの酵素でベクターを消化し、アガロース電気泳動でインサートの確認を行った。この後、得られたALSホモログ保持プラスミドベクターをRNaseA、PEG、LiCl等を使用する常法に従って精製し、プライマー及びABI BigDyeTerminator Cycle Sequencing kitを用いシーケンス反応を行った。PCRの条件はプロトコールに従った。

またプライマーはM13プライマー及び決定した塩基配列から設計した合成プライマーを用いた。得られたPCR産物をエタノール沈殿で精製し、ABI PRISM 310シーケンサーで塩基配列を決定した。

#### 【 0 0 7 1 】

このALSホモログ保持プラスミドベクターには、1.6 kbpのインサートDNAが入っているという情報であった。得られたALSホモログ保持プラスミドベクターをSal IとNot Iの制限酵素で消化し、電気泳動を行ったところ、pBluescript II SK+に相当する約3 kbpのバンドとインサートDNA断片に相当する1.6 kbpのバンドが検出された（図示せず）。インサートDNA部分についての全塩基配列を決定し、トウモロコシの塩基配列の相同性検索を行った結果、図 1 8 A 及び図 1 8 B に示すように、84.7%の相同性を示した。したがって、このALSホモログは日本晴におけるALS遺伝子の部分cDNAであると判断されたので、Sal I 及びNot I で消化して切り出したインサートDNAをプローブとした。なお、図 1 8 A 及び図 1 8 B において、一列目は日本晴におけるALS遺伝子のcDNAの塩基配列であり、二列目はトウモロコシにおけるALS遺伝子の塩基配列である。

#### 【 0 0 7 2 】

##### （ 2 ） 抵抗性変異株及び野性株からのmRNAの調製

先ず、液体窒素で凍結した抵抗性変異株を、乳鉢と乳棒を用いて摩砕した後、ミキサーにより30秒間細かく粉砕した。粉砕後の粉末を抽出緩衝液〔（100 mM Tris-HCl pH 9.0, 100 mM NaCl, 1重量% SDS, 5 mM EDTA）：（ $\beta$ -mercaptoethanol）：（Tris飽和フェノール）=15：3：20〕中に懸濁し、その後よく攪拌した。この溶液を12000×gで15分間遠心し上澄を回収し、200 mlのPCI〔（Tris飽和フェノール）：（chloroform）：（isoamylalcohol）=25：24：1〕を加え、4℃で10分間振とうした後、12000×gで15分間遠心し上澄を回収した。この操作を2回繰り返した。得られた上澄に1/20量の5 MのNaCl、2.2倍量のエタノールを加え、-80℃で30分間静置した後、12000×gで5分間遠心することで沈殿を回収した。沈殿を70 %エタノールで洗浄し、乾燥させた後に10 mMの $\beta$ -メルカプトエタノール溶液に溶かし、この溶液を27000×gで10分間遠心して不溶性画分を除いた後、10 MのLiClを1/4量加えて氷上で1時間静置した。これをさらに27000×gで10分間

遠心して沈殿を回収し、4 mlの $H_2O$ に溶かした後、260 nmの吸光度を測定してRNAの濃度を求めた。これに1/20量の5 M NaClと2.2倍量のエタノールを加えて、 $-80^{\circ}C$ で30分間静置した後、 $27000 \times g$ で10分間遠心して沈殿を回収し、70 %エタノールで洗浄後乾燥させた。これを適量の $H_2O$ に溶かしトータルRNA溶液とした。なお、遠心操作は $4^{\circ}C$ で行った。

## 【 0 0 7 3 】

このトータルRNAから次の方法でmRNAの分離精製した。抽出したトータルRNA溶液の液量に対して等量の2×結合バッファー (20 mM Tris-HCl(pH 7.5), 10mM EDTA, 1 M NaCl) を加えた。0.1 gのoligo dT cellulose(アマシヤム バイオサイエンス社製)を詰めたカラムを1×結合バッファーで洗浄した後、このトータルRNA溶液をカラムにかけた。1×結合バッファーで洗浄した後、溶出バッファー (10 mM Tris-HCl(pH 7.5), 5 mM EDTA) をアプライし、溶出液を0.5 mlずつ回収した。なお、カラムを素通りした画分については、別のoligo dT cellulose (アマシヤム バイオサイエンス社製) カラムにかけ、同様の操作を行った。各画分の吸光度から溶出されたmRNAの濃度を計算した後、1/10量の10 M LiClと2.5倍量のエタノールを加えて $-80^{\circ}C$ で30分間静置した。これを遠心して沈殿画分を乾燥した後100  $\mu$  lの $H_2O$ に溶かした。こうして得られたmRNAをショ糖密度勾配遠心法によりサイズ分画した。

## 【 0 0 7 4 】

分離精製したmRNAを、25 % ショ糖溶液及び5 % ショ糖溶液を用いて密度勾配をつけた遠心管にアプライし、スウィングローターを用いて $4^{\circ}C$ 、27000 rpmで15時間超遠心を行った。遠心後、密度勾配の順に各0.5 mlずつ分画回収した。それぞれの画分の吸光度を測定し、回収されたmRNAの濃度を計算するとともにECLキット (ECL direct nucleic acid labelling and detection system, アマシヤム バイオサイエンス社製) によるハイブリダイゼーションによりALS mRNAの存在を確認した。ハイブリダイゼーションは、上記(1)で調製したプローブを用いて $42^{\circ}C$ で16時間行った。また、ハイブリダイゼーション後の洗浄は、キット添付の1次洗浄バッファーを用いて $42^{\circ}C$ で5分間を2回、その後、2×SSC溶液を用いて $42^{\circ}C$ で5分間を1回行った。洗浄後の膜は、透明のプラスチックフィルムで包み



キット付属の発光試薬に浸し多状態を維持し、その後、X線フィルムに感光させた。

#### 【0075】

これらの操作により、抵抗性変異株としてSr系統を用いた場合には、約35 mgのトータルRNAを抽出するとともに、約4 mgのmRNAを抽出することができた。また、ショ糖密度勾配遠心法では、予想される画分にハイブリダイゼーション陽性のスポットが認められた。

一方、野生株を用いたところ、約95mgのトータルRNAを抽出するとともに、約7 mgのmRNAを抽出することができた。野生株からmRNAを抽出する際には、抵抗性変異株に代えて野生株を使用した以外は、上述した方法を適用した。

#### 【0076】

##### (3) 抵抗性変異株及び野性株由来のcDNAライブラリの作製

上記(2)で精製したmRNA2  $\mu$ g及びcDNA合成キット(アマシャム バイオサイエンス社製)を用いてcDNAの合成を行い、抵抗性変異株由来のcDNAライブラリの作製した。

先ず、逆転写反応にはキット添付のRTaseを使用し、その後の相補鎖伸長反応にはキットに添付のT4 DNA polymeraseを使用した。相補鎖伸長反応の際には、cDNA合成の収率を計算するために $^{32}$ P-dCTPを加えた。合成したcDNAは、アダプターを付加した後、in vitroパッケージング法により $\lambda$ ファージへ組み込んだ。

#### 【0077】

cDNAに付加するアダプターとしては、宝酒造株式会社製のEco RI-Not I-Bam H Iアダプターを使用した。cDNAを含む溶液にcDNAに対してモル濃度で50倍のアダプターを加え、この混合溶液にT4 DNA Ligase(ファルマシア社製)を加えてライゲーション反応を4℃で一晩行った。この反応溶液をAsahiPak GS 710カラム(旭化成工業株式会社製)を用いてHPCLにアプライし、溶出液を波長260 nmの紫外線でモニターした。溶出液を0.5 ml程度ずつ25本に分画し、各フラクションをCerenkovカウンターで測定し、カウントの高いフラクションを3~4本回収した。このフラクションをT4 polynucleotide kinase(宝酒造株式会社製)を用いてアダプターの5'末端をリン酸化した後、 $\lambda$ gt 11 Eco RIアームを加えてライゲーション

ョンした。ライゲーション反応は、溶液にGigaPack Gold III (Stratagene社製) を加えて室温で2時間行った。反応終了後、200  $\mu$  lのSMバッファーと8  $\mu$  lのクロロホルムを加えてファージ溶液とした。このファージ溶液を10倍希釈し、これの1  $\mu$  lを大腸菌 (Y-1088) に感染させた後、0.7 % トッパアガーを加え、LBプレートに蒔き、4時間から8時間後にプレートに現れたプラークの数を数えることでタイターを測定した。

## 【0078】

DE 81ペーパーとCerenkovカウンティングの結果からSr系統由来のcDNAが約74 ng合成されたことが判った。アダプターを付加したベクターのライゲーション後のCerenkovカウンティングの結果からSr系統について約22 ngのインサートが挿入された $\lambda$  DNAが得られた。この $\lambda$  DNAをファージヘパッキングし、これを抵抗性変異株細胞由来のcDNAライブラリとした。このライブラリ溶液のタイターは、16600 pfu/ $\mu$  lであった。

## 【0079】

一方、野生株から抽出したmRNAを用いて、上述した方法に準じてcDNAライブラリを調製したところ、野生株由来のcDNAが約38 ng合成されたことが判った。また、野生株についてインサートが挿入された $\lambda$  DNAが約5 ng得られた。さらに、野生株由来のcDNAライブラリ溶液のタイターは18160 pfu/ $\mu$  lであった。

## 【0080】

## (4) ALS遺伝子を含むcDNAのスクリーニング

プレートに20000個程度のプラークが出るように、上記(3)で調製したライブラリ溶液を希釈した後、野生株由来及びSr系統由来のファージをそれぞれ10枚ずつ蒔いた。プラークをニトロセルロースメンブレン (Schleicher & Schnell社製, PROTORAN BA85, ポアサイズ0.45  $\mu$  m) へ転写し、転写したニトロセルロースメンブレンを変性溶液 (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)、続いて中和溶液 (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl (pH7.5), 1 mM EDTA) に約20秒浸した。濾紙を用いてニトロセルロースメンブレンから余分な水分を除去した後、ニトロセルロースメンブレンを80℃で2時間ベーキングした。なお、ニトロセルロースメンブレンに代えてHybond-N+ (アマシャム バイオテック社製) を用いた際には、ベーキング操作は

省略し、0.4 M NaOHにて20分間固定した。

#### 【0081】

上記(1)で調製したインサートDNAを、RI及び非RIの2種類の方法でラベル化しプローブDNAとして使用した。RIラベル化とハイブリダイゼーションは次の方法で行った。まず、約200～500 ngのプローブDNAを熱変性させた。BcaBEST DNA labelling kit (宝酒造株式会社製)を用いてラベルを行った。このラベル化反応に際して、キットに添付のバッファー、ランダムプライマー及び<sup>32</sup>P-dCTPを加えた。BcaBESTを加え、65℃で30分間インキュベートした。その後、EDTAを加えて反応を停止させた。ニトロセルロースメンブレン8枚程度にプローブがおよそ100 ng程度含まれる容量を加え、42℃、一晚、微振とうでハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、2×SSC, 0.1% SDS溶液で3回洗浄した後、BAS 2000イメージングアナライザー (富士フイルム株式会社製) のイメージングプレートに約1時間露光させた。露光後イメージングアナライザーを用いて陽性クローンを検出した。

#### 【0082】

一方、非RIラベル化は次の方法で行った。約200～500 ngのプローブDNAを熱変性させた後、ECLダイレクトDNA/RNAラベリング・検出システム (アマシャム バイオサイエンス社製) 添付のDNA標識試薬 (ペルオキシダーゼ) 及びグルタルアルデヒドを加えて37℃でインキュベートした。この場合、ニトロセルロースメンブレン膜8枚程度におよそ100 ng程度のラベル化プローブDNAが含まれるように添加した後、42℃、一晚、微振とうでハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション終了後、primary washing bufferを室温、10分間、3回、その後2×SSCで室温、10分間、1回で膜の洗浄を行った。膜をECLキット添付の発光液に浸し、30分から3時間でX線フィルムに露光した。

#### 【0083】

ハイブリダイゼーション (1次スクリーニング) の結果得られた陽性ファージを滅菌した爪楊枝でトップアガーごと掻き取り、200 μlのSMバッファーに懸濁し、ファージ溶液を得た。このファージ溶液を各クローンごと適宜希釈を行い、大腸菌Y-1088株に感染させ、LBプレートに蒔いた。この新たに作製したプレート

を用いて、同様にハイブリダイゼーション（2次スクリーニング）を行い、陽性ファージを200  $\mu$ lのSMバッファーに懸濁し、シングルファージとした。なお、2次スクリーニングでシングルファージとして単離できなかった場合、もう一度希釈してLBプレートに蒔き、ハイブリダイゼーション（3次スクリーニング）を行ってシングルファージにした。

## 【0084】

このシングルファージから次の方法で $\lambda$  DNAを調製した。竹串又は爪楊枝を使って陽性クローンのプラークから集めた $\lambda$ ファージを、新鮮な宿主大腸菌（Y1088）懸濁液を5  $\mu$ l含む200  $\mu$ lの2xYT培地（10 mM  $MgCl_2$ と0.2 %マルトースを含む）にイノキュレートした。静置状態42℃で一晩インキュベートした後、再度宿主大腸菌（Y1088）懸濁液を25  $\mu$ l含む1 mlの2xYT培地（10 mM  $MgCl_2$ と0.2 %マルトースを含む）にイノキュレートし一晩振とう培養した（以上が前培養）。前培養した溶液（10～50  $\mu$ l）を10 mMの $MgCl_2$ と0.5 mlの大腸菌Y1088懸濁液とを含む12 mlの2xYT培地にイノキュレートし、比較的強く振とうしながら溶菌後濁度が増すまで42℃で一晩インキュベートした。培養終了後、50  $\mu$ lのクロロホルムと1.2 mlの5 M NaClを加え、振とうしながら42℃で10分間インキュベートした。これを27000 $\times$ gで10分間遠心した後、新たに遠心管に移した上澄に5 mlの50 % PEGを加え、氷上で1時間以上インキュベートした。これを27000 $\times$ gで10分間遠心し上澄を捨てた後、再度27000 $\times$ gで遠心して液体部分を捨てた。沈澱画分を4  $\mu$ gのDNase I、20  $\mu$ gのRNase Aならびに10 mMの $MgCl_2$ を含む30mMのトリス塩酸緩衝液pH7.5の300  $\mu$ lに懸濁させ、1.5 mlチューブへ移した。この懸濁液を37℃で30分間インキュベートした後、7.5  $\mu$ lの20%SDS、3  $\mu$ lのproteinase K（10 mg/ml）、12  $\mu$ lの0.5 M EDTAを加え、さらに55℃で15分間インキュベートした。これに150  $\mu$ lのフェノールを加えて激しく攪拌した後、トミーマイクロ遠心機MR-150（トミー精工社製）を用いて15000 rpmで3分間遠心し、水層を回収した。集めた水層に800  $\mu$ lのエチルエーテル（蒸留水を加えて過酸化物を除いておく）を加え激しく攪拌した後、15000 rpmで10秒間遠心しエーテル層を捨てた。このエーテル抽出操作を繰り返した後、水層に残存するエーテルを窒素ガスで除去した。水層に30  $\mu$ lの5 M NaCl、875  $\mu$ lのエタノールを加えることで沈澱してきた $\lambda$  DNAを速

やかに回収し、 $\lambda$  DNAを1 ml程度の70 %エタノールでリンスした後、約1分間減圧下で乾燥させてエタノールを除いた。これを20  $\mu$  l～50  $\mu$  lのTE 緩衝液 (pH 8.0) に溶かして $\lambda$  DNA溶液とした。

#### 【0085】

得られた $\lambda$  DNA中のインサートDNAのサブクローニング及び塩基配列決定は次の方法で行った。得られた $\lambda$  DNA溶液 (1  $\mu$  l) をNot Iで消化し、インサートDNAを切り出した。切り出し反応の反応液組成は制限酵素添付の説明書に従い、37℃で約2時間反応させた後、1 %アガロースゲルを使用した電気泳動でインサートサイズの確認を行った。インサートDNAを持つ $\lambda$  DNA (10  $\mu$  l～ 20  $\mu$  l) をNot Iで消化し、インサートDNAを切り出した。これを分取用のアガロースゲルで分離した後、相当するバンドをゲルから切り出し、常法によりインサートDNAを精製した。このインサートDNAとBAP処理 (エピのアルカリフォスファターゼを用いた脱リン酸化処理) したベクターとをモル比で1 : 1の割合で混合し、T4 DNAリガーゼで16℃、2時間以上ライゲーション反応を行った。なお、インサートDNAはNot Iで切り出したものを材料としたので、BAP処理についてもNot Iで切断したベクターについて行った。ライゲーション終了後、その溶液の一部をコンピテントセル (DH 5 $\alpha$ ) と混合し、氷上に30分間放置した。これを42℃で30秒間ヒートショックを行い、さらに氷上に2分間放置した。続いてSOCを添加し37℃で1時間インキュベートした後、2 $\times$ YT (50  $\mu$  g/mlのアンプシリン入り) の100  $\mu$  l及び3 % X-Gal 30  $\mu$  lならびに1 M IPTG 3  $\mu$  lを混合したものを事前に均一になるようにまいておいたLB培地上プレートにまき、37℃で10時間以上培養した。形質転換された白色コロニーをアンプシリン入りのLB培地あるいは2 $\times$ YT培地の2 mlに1つのコロニーを接種した後37℃で一晩培養した。この培養液から常法によりプラスミドを調製しH<sub>2</sub>Oに溶かしDNA濃度を定量した後シーケンス用PCR反応に供した。PCR反応及び塩基配列決定は上述した方法で行った。

#### 【0086】

以上の実験により、野性型及びSr系統のそれぞれの培養細胞から約2.2 kbの不完全長のALS cDNAが得られた。このDNAの5' 側から約250 bpの位置にSma Iサイトが存在したので、さらに次の方法で新たなプローブを作製した。野生株由来の約

2.2 kbpの不完全長のALS cDNAを保持するpBluescript II SK+を宿主大腸菌のJM109で増やした後、プラスミドを自動分離装置 (KURABO PI-100) で抽出した。このプラスミドを直接Sma Iで消化し、生成した約250 bp の断片を1 %のアガロース電気泳動で分離精製し濃度を算出後プローブとした。このプローブを用いて上述のRIを使用した方法で再度ライブラリをスクリーニングした。その結果得られたシングファージからλ DNAを調製し、そのλ DNA溶液 (1 μl) をEco RIで消化し、電気泳動でサイズを確認した後、ニトロセルロースメンブランに固定した。電気泳動後のゲルを1.5 M NaClを含む0.5 M NaOH 溶液中に浸し15分間程度軽く振とうした。この後ゲルを水洗し、3 MのNaClを含む0.5 M Tris-HCl (pH7.5) に浸し15分程度振とうしながらゲルを中和した。ステンレスバットに20×SSCを張り、その中に工業用の厚手のろ紙を5枚程度重ねた台座を置いた。その上に中和後のゲル、メンブラン (所定の大きさに切断したニトロセルロースメンブランを蒸留水になじませた後、20×SSCでさらに10分間なじませた)、2枚重ねのろ紙を順番に乗せた後、さらにその上に3cm~4cm厚のペーパータオルを重ねた。この上にガラス板を乗せ、その上に軽い重しを乗せた後、約5分間ブロッティングを行った。この後、ゲルとメンブランの間に気泡が入っていないことを確かめた上で10分間程度ブロッティングを行った。ブロッティング終了後、メンブランをトランスイルミネーターでUV処理し、15分から30分程度80℃でベーキングした。ベーキング終了後、<sup>32</sup>Pでラベルした上述の250 bpプローブDNAによるハイブリダイゼーション (ハイブリダイゼーション緩衝液組成: 5×SSPE, 0.5% SDS, 5×Denharlts, solum sperm DNA, 50 %formamide) を行い、結合したバンドの放射能をイメージングプレートへ写し取り、BAS-2000でその結果を解析した。このハイブリダイゼーションで陽性を示したインサートの中で比較的大きなサイズを示したものを大量に調製し、上述した方法でEco RI消化後BAP処理したpBluescript IISK+にサブクローニングした。これを大腸菌 (JM 105) に形質転換し、得られた形質転換体を液体培養後、常法によりプラスミドを調製し、上述の方法で塩基配列を決定した。

【 0 0 8 7 】

その結果、野性型及びSr系統のそれぞれの培養細胞からALS完全長 cDNAを取得

することができた。これらの野生型と変異型ALS遺伝子相同性を比較した結果を図19A、図19B及び図19Cに示した。図19A、図19B及び図19Cに示すように、Sr系統では、野生型と比較して、転写開始コドンATGの最初の塩基Aを起点として1643番目及び1880番目の2点の変異が認められた。Sr系統では、野生型における1643番目のGがTに変異（G1643Tと表記する）し、野生型における1880番目のGがTに変異（G1880Tと表記する）していた。これらの変異はアミノ酸に変換すると、Sr系統の変異型ALSタンパク質は、野生型ALSタンパク質における548番目のトリプトファンがロイシンへ変異（すなわち「W548L変異」）し、野生型ALSタンパク質における627番目のセリンがイソロイシンへ変異（すなわち「S627I変異」）したアミノ酸配列を有することを意味していた。

#### 【0088】

（5）pBluescript II SK+へクローニングした野生型ALS cDNAのpGEX 2Tへのサブクローニング

上記（4）で得られた野生型ALS完全長cDNAを組み込んだpBluescript II SK+プラスミドをEco RIで消化して、野生型ALS遺伝子を含むcDNAを切り出した後、大腸菌発現ベクターであるpGEX-2T（アマシャムバイオサイエンス社製）のEco RIサイトに組み込んだ。以下、pGEX-2TにおけるEco RIサイトに野生型ALS完全長cDNAを組み込んだ発現ベクターを、「pGEX-2T(ALS-wild)」と呼ぶ。pGEX-2T(ALS-wild)を大腸菌（JM 109）に形質転換し、形質転換により得られたコロニーを液体培養してプラスミドを抽出し、シーケンスによりインサートDNAの挿入方向を確認した。これによりpGEX-2T(ALS-wild)で形質転換した大腸菌（JM109）を作製した。

#### 【0089】

〔実施例4〕PC除草剤抵抗性イネ培養細胞ALS遺伝子の変異部位の解明

（1）抵抗性変異株（Sr, Rb, Vg, Ga系統株）からのゲノムDNAの抽出

植物DNA抽出キットISOPLANT II（ニッポンジーン社）を用い、添付のプロトコルに従って、Sr、Rb、Vg及びGa系統のそれぞれの培養細胞0.1 gからゲノムDNAを抽出した。上記キットでゲノムDNAを抽出した後、RNase AでRNAを分解除去した。その後、アガロースゲルで電気泳動し、ゲノムDNAを確認した。

## 【 0 0 9 0 】

## (2) ゲノムDNAを鋳型としたALS遺伝子のPCR

それぞれのゲノムDNAを鋳型とし、下記に示すプライマー「ALS-Rsp3」とプライマー「4-83-3」を用いてPCRを行った。PCRは、Ready to Go PCR Beads(アマシャムバイオサイエンス社製)を用い、最終容量25  $\mu$ lで行った。反応条件としては、94℃で5分間初期変性工程を行い、続いて、94℃で30秒間の変性工程、55℃で1分間のアニーリング工程及び72℃で2分間の伸長工程からなるサイクルを40回行うものとし、最終サイクルの伸長工程を72℃で9分間行うものとした。

## 【 0 0 9 1 】

次に、PCR反応液を2 %アガロースゲルで電気泳動(100V, 1 X TBE buffer)した後、PCR生成物を含むゲルを切り出し、切り出したゲルを小さな断片に切断した。得られたゲル断片を滅菌イオン交換水で2、3度リンスした後、500  $\mu$ lの滅菌イオン交換水を入れ、凍結・溶解を3回繰り返した。これにより、PCR生成物を水中に溶出することができた。

## 【 0 0 9 2 】

次に、このPCR生成物が溶存する溶出液を用いたPCRを再度行った。すなわち、このPCRでは、溶液中に含まれるPCR生成物を鋳型とし、同一のプライマーセットを用いるか、或いは内子のプライマー (nested primer) を用い、最終容量100  $\mu$ lで行った。反応終了後、反応液を分取用アガロースゲル(1 %)で電気泳動した後、目的のバンドを含むゲルを切り出し、GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit (アマシャムバイオサイエンス社製)を用いて精製した。そして、最終的に75  $\mu$ lの滅菌脱イオン水でPCR生成物を溶出した。

## 【 0 0 9 3 】

## (3) シークエンシング

PCRにより増幅されたDNA断片を鋳型として、ABI PRISM BigDye ver.2 (アプライドバイオシステム社製)を用いてシーケンス反応を行った。シーケンス反応に際しては、鋳型DNAを11  $\mu$ l、プライマー(3.2 pmol/ $\mu$ l)を1  $\mu$ l、pre-mixを8  $\mu$ lとし、総容量を20  $\mu$ lとした。シーケンス反応条件は、96℃で5分間の初期変性工程、続いて、96℃で5秒間の変性工程、50℃で5秒間のアニーリング工程



及び60℃で4分間の伸長工程からなるサイクル40回行い、最終サイクルの伸長工程を60℃で9分間行うものとした。シーケンス反応後、AutoSeq G-50 column(アマシヤム バイオテック社製)を用い反応液中の蛍光塩基をゲル濾過により除去し、ABI PRISM 310 DNA シーケンサーにより塩基配列を読んだ。

## 【 0 0 9 4 】

## (4) 使用したプライマーの名称及び塩基配列

上記(2)で用いたプライマー及び、以下の実施例で使用したプライマーについて、名称及び塩基配列等を表6にまとめた。

## 【 0 0 9 5 】

【表6】

名称	塩基配列	方向	対応 ALS 部位	塩基数
ALS-Rsp1	5'-GCTCTGCTACAACAGGCACA-3'	センス	1192-1212	21mer
ALS-Rsp2	5'-AGTCCTGCCATCACCATCCAG-3'	アンチセンス	1906-1926	21mer
ALS-Rsp3	5'-CTGGGACACCTCGATGAAT-3'	センス	720-738	19mer
ALS-Rsp4	5'-CAACAAACCAGCGCAATTCGTCACC-3'	アンチセンス	862-886	25mer
ALS-Rsp6	5'-CATCACCACACCTCTT-3'	センス	327-344	18mer
ALS-Rsp7	5'-AACTGGGATACCAGTCAGTC-3'	アンチセンス	886-906	21mer
ALS-RspA	5'-TGTGCTTGGTGATGGA-3'	アンチセンス	571-586	16mer
ALS-RspB	5'-TCAAGGACATGATCTGGATGG-3'	センス	1913-1944	16mer
ALS-RspC	5'-CAGCGACGTGTTCCGCTA-3'	センス	258-275	16mer
ALS-RspD	5'-CCACCGACATAGAGAATC-3'	アンチセンス	828-845	18mer
ALS-RspF	5'-ACACGGACTGCAGGAATA-3'	アンチセンス	1749-1766	18mer
ALS-RspE	5'-TTACAAGGCGAATAGGGC-3'	センス	1656-1673	18mer
3-1-1	5'-GCATCTTCTTGATGGCG-3'	アンチセンス	1791-1807	17mer
3-1-2	5'-ATGCATGGCAGGTTGTAC-3'	センス	973-990	18mer
3-1-3	5'-GATTGCCTCACCTTTTCG-3'	アンチセンス	1346-1362	17mer
3-1-4	5'-AGGTGTCACAGTTGTTG-3'	センス	1506-1522	17mer
4-83-1	5'-AGAGGTGGTTGGTGATG-3'	アンチセンス	327-343	17mer
4-83-3	5'-GCTTTGCCAACATACAG-3'	アンチセンス	1944-1960	17mer
4-83-10	5'-CAGCCCAAATCCCATG-3'	アンチセンス	1457-1473	17mer
4-83-15	5'-ATGTACCCTGGTAGATTG-3'	アンチセンス	735-752	18mer
ALS-DG7	5'-GTITT (CT) GCITA (CT) CCIGG (ACGT) GG-3'	センス	265-284	20mer

## 【 0 0 9 6 】

なお、表6中、対応ALS部位は、転写開始コドン(ATG)を起点とした場合の対応する塩基の番号である。また、ALS-Rsp1の塩基配列は配列番号9に示し、ALS-Rsp2の塩基配列は配列番号10に示し、ALS-Rsp3の塩基配列は配列番号11に示し、ALS-Rsp4の塩基配列は配列番号12に示し、ALS-Rsp6の塩基配列は配列番号13に示し、ALS-Rsp7の塩基配列は配列番号14に示し、ALS-RspAの塩基配列は

配列番号 1 5 に示し、ALS-RspB の塩基配列は配列番号 1 6 に示し、ALS-RspC の塩基配列は配列番号 1 7 に示し、ALS-RspD の塩基配列は配列番号 1 8 に示し、ALS-RspF の塩基配列は配列番号 1 9 に示し、ALS-RspE の塩基配列は配列番号 2 0 に示し、3-1-1 の塩基配列は配列番号 2 1 に示し、3-1-2 の塩基配列は配列番号 2 2 に示し、3-1-3 の塩基配列は配列番号 2 3 に示し、3-1-4 の塩基配列は配列番号 2 4 に示し、4-83-1 の塩基配列は配列番号 2 5 に示し、4-83-3 の塩基配列は配列番号 2 6 に示し、4-83-10 の塩基配列は配列番号 2 7 に示し、4-83-15 の塩基配列は配列番号 2 8 に示し、ALS-DG7 の塩基配列は配列番号 2 9 に示した。

## 【 0 0 9 7 】

(5) シークエンスの結果明らかになった各系統における変異

上記 (3) で決定した塩基配列解析の結果、Rb 系統、Vg 系統、Ga 系統及び Sr 系統の変異が明らかとなった。各系統の変異点を表 7 にまとめる。

## 【 0 0 9 8 】

【表 7】

変異塩基 変異アミノ酸	C512A P171H	C514A R172S	G1643T W548L	G1880T S627I
Rb 系統	○ ホモ		○ ヘテロ	
Vg 系統			○ ヘテロ	
Ga 系統	○ ホモ又はヘテロ	○ ホモ又はヘテロ	○ ヘテロ	
Sr 系統			○ ヘテロ	○ ヘテロ

## 【 0 0 9 9 】

表 7 に示すように、Rb 系統株では塩基配列における 512 番目の C が A にホモに、1 643 番目の G が T にヘテロに変異していた。これはアミノ酸レベルでは 171 番目のプロリンと 548 番目のトリプトファン (W) がそれぞれヒスチジン (H) とロイシン (L) に変異していることを意味している。Vg 系統株では塩基配列における 1643 番目の G が T にヘテロに変異しており、これはアミノ酸レベルでは 548 番目のトリプトファン (W) がロイシン (L) に変異していることになる。Ga 系統株では塩基配列における 512 番目と 514 番目の C が A にホモかヘテロ (得られた PCR 生成物により異なっていた) に、1643 番目の G が T にヘテロに変異していた。これはアミノ酸レベルでは 171 番目のプロリン (P) と 172 番目のアルギニン (R) 及び 548 番目のトリプトファン (W) が

それぞれヒスチジン(H)、セリン(S)及びロイシン(L)に変異していることを意味している。またSr系統株では塩基配列における1643番目と1880番目の双方のGがTにヘテロに変異していた。

#### 【0100】

上述した方法でSr系統株のcDNAライブラリーからALS遺伝子をスクリーニングして単離した際、2点変異型遺伝子だけではなく野性型の遺伝子の遺伝子も単離されたことからゲノムDNAレベルではヘテロに変異していると推定していたが、ゲノムPCRによる結果もそれを裏付ける結果となった。

#### 【0101】

以上のように全ての抵抗性変異株で548番目のトリプトファン(W)はヘテロにロイシン(L)に変異しており、Vg系統がこの変異のみを有していた。上述したようにbispyribac-sodiumに対する感受性はVg系統株では10 $\mu$ Mまで、Sr、Rb、Ga系統株では100 $\mu$ Mまで抵抗性を示していた。このことから抵抗性の獲得はその淘汰圧の強度が強くなると共にVg系統を起点にその他の系統に分岐し変異していったと推察された。

#### 【0102】

〔実施例5〕 G1643T (W548L) 及びG1880T (S627I) のそれぞれの変異を単独で持つALS cDNAの合成とこれを保持するpGEX 2Tの作製並びにこのベクターによる大腸菌の形質転換

まず、G1643T (W548L) 及びG1880T (S627I) のそれぞれの変異を単独で持つALS cDNAの合成とこれを保持するpGEX 2Tの作製について、図20を用いて説明する。

#### 【0103】

pBluescript II SK+(ALS-2 point mutant) 或いはpBluescript II SK+(ALS-wild) の1 $\mu$ l (各々585 ng/ $\mu$ l 及び554 ng/ $\mu$ l) を鋳型として、LA Taq DNA polymerase (Takara社製) の1 $\mu$ lを用い、最終反応量100 $\mu$ lでPCRを行った。反応条件は95℃で30秒間、55℃で30秒間及び72℃で2分間からなるサイクルを25回繰り返した。なおpBluescript II SK+(ALS-2 point mutant)は、G1643T (W548L) 及びG1880T (S627I) の2点変異型のALS遺伝子を含んでいる。pBluescript II SK+(ALS-

wild)は、変異を持たない野生型のALS遺伝子を含んでいる。PCRに際して、プライマーはALS-Rsp6とALS-RspFの組み合わせ及びALS-RspEとM13Rの組み合わせを用いた。鋳型となるALS遺伝子と所定の組合せのプライマーとにより増幅される断片の名称を表8にまとめた。なお、プライマー-M13Rは、pBluescript II SK+のT3プロモーター近傍のアンチセンスプライマーである。また、M13Rの塩基配列は、5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'（配列番号30）である。

【0104】

【表8】

	pBluescript II SK+ (ALS-2 point mutant)	pBluescript II SK+ (ALS-wild)
ALS-Rsp6 ALS-RspF	PCR-1	PCR-3
ALS-RspE M13R	PCR-2	PCR-4

【0105】

PCRによって得られたPCR-1、PCR-2、PCR-3及びPCR-4をそれぞれアガロースゲル電気泳動で分離した後、アガロースゲルから前述と同様に回収し、50 $\mu$ l滅菌水で溶出した。

【0106】

次に、PCR-1及びPCR-4のセットと、PCR-2及びPCR-3のセットとを用いてSPR (self polymerase reaction) に供した。SPRは、PCR-1及びPCR-4のセット或いはPCR-2及びPCR-3のセット23.5 $\mu$ lとLA Taq DNA polymerase 1 $\mu$ lとを加え、最終容量75 $\mu$ lとし、95℃で1分間の変性工程、55℃で30秒間のアニーリング工程及び72℃で2分間の伸長工程からなるサイクルを25回行うものとした。PCR-1及びPCR-4のセットを用いたSPRで得られたDNA断片をSPR-1とし、PCR-2及びPCR-3のセットを用いたSPRで得られたDNA断片をSPR-2とした。

【0107】

なお、本例では、十分量のSPR-1とSPR-2と確保するため、精製されたSPR-1或いはSPR-2を鋳型とし、ALS-Rsp6及びM13Rを用いて再度LA Taq DNA polymeraseにより最終反応量100 $\mu$ lでPCRをそれぞれ行った。このときのPCRは、95℃で30秒間の変性工程、55℃で30秒間のアニーリング工程及び72℃で2分間の伸長工程から

なるサイクルを25回繰り返した。このPCRの後、反応溶液をアガロースゲル電気泳動に供し、約2 kbpのシングルバンド（PCR産物）をアガロースゲルから回収し、100  $\mu$ l滅菌水で溶出した。

## 【0108】

次に、PCRによって増幅したSPR-1とSPR-2をAcc I及びEco RIによりそれぞれ消化し、SPR-1(Acc I/Eco RI消化断片)とSPR-2(Acc I/Eco RI消化断片)を得た。すなわち、PCR産物が溶存する100  $\mu$ lの滅菌水のうち50  $\mu$ lを、10 x M buffer (Takara社製) 存在下、Acc I 1  $\mu$ l (12u/ $\mu$ l)及びEco RI 1  $\mu$ l(12u/ $\mu$ l)と混合し、最終容量60  $\mu$ lで37℃、1時間インキュベートした。その後、反応溶液全量をアガロースゲル電気泳動に供し、目的の1.5 kbpの断片をGFX PCR and Gel Purification Kitで回収した。回収した1.5 kbpの断片を50  $\mu$ lの滅菌水で溶出することによって、SPR-1(Acc I/Eco RI消化断片)を含む溶液とSPR-2(Acc I/Eco RI消化断片)を含む溶液とを調製した。

## 【0109】

一方、野性型ALS遺伝子が組み込まれたタンパク質発現ベクター、pGEX-2T(ALS-wild)プラスミド(濃度約50 ng/ $\mu$ l)の150  $\mu$ lを、10 X M buffer存在下でAcc I 1  $\mu$ l(12 u/ $\mu$ l, Takara社製)と混合し、37℃で2時間インキュベートした。反応終了後、1 %アガロースゲル電気泳動により直鎖状になった7.2 kbpのバンドを確認した。GFX PCR and Gel Purification Kitのプロトコルに従いこのアガロースゲルから、7.2 kbpのバンドに相当するDNAを回収後、180  $\mu$ lの滅菌水で溶出した。その内89  $\mu$ lを、10  $\mu$ lの10 x H buffer (Takara社製)及び1  $\mu$ lのEco RI (12u/ $\mu$ l) と混合し、37℃で1分間反応することによって、回収したDNAをEco RIで部分消化した。反応終了後、10 x loading bufferを加え、1.5 %アガロースゲルで電気泳動したところ、4.9 kbp、5.7 kbp、6.5 kbp及び全く切断されない7.2 kbpのバンドに分かれ、目的の5.7 kbpのバンドをゲルから切り出した。切り出したゲルに含まれる約5.7 kbpのDNA断片を、GFX PCR and Gel Purification Kitにより回収し、その後、50  $\mu$ lの滅菌水で溶出した。

## 【0110】

そして、このようにして得られたpGEX-2T(ALS-wild)のAcc I消化及びEco RI部

分消化断片の $3\mu\text{l}$ とSPR-1(Acc I/Eco RI消化断片)或いはSPR-2(Acc I/Eco RI消化断片)の $3\mu\text{l}$ とを、それぞれTakara ligation buffer (ver.2, I液)  $6\mu\text{l}$ と $16^\circ\text{C}$ で1晩反応させた。

#### 【0111】

次に、反応液を大腸菌コンピテントセル (JM109株、Takara社製) に添付のプロトコルに従ってそれぞれ形質転換し、アンピシリン50ppmを含むLB培地に播き、 $37^\circ\text{C}$ で1晩インキュベートした。この結果、現れたコロニーの中から数点を選び、表6に記載したALS-RspE及びPGEX-3 (5'-CCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGG-3' : 配列番号31) のセットと、PGEX-5 (5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3' : 配列番号32) 及びPGEX-3のセットと、PGEX-5及び表6に記載したALS-RspAのセットとを用いてコロニーを鋳型にしてダイレクトにPCRを行った。なお、PGEX-3は、ベクターとして使用したpGEX-2Tの3'側に位置するアンチセンス鎖の一部と同じ配列である。PGEX-5は、ベクターとして使用したpGEX-2Tの5'側に位置するセンス鎖の一部と同じ配列である。反応条件としては、ALS-RspE/PGEX-3セットのときには、総量 $25\mu\text{l}$ 中、各々のプライマーを $1\mu\text{M}$ とPCR bead1個を溶解し、 $95^\circ\text{C}$ で30秒間の変性工程、 $55^\circ\text{C}$ で1分間のアニーリング工程及び $72^\circ\text{C}$ で2分間の伸長工程からなるサイクルを40回繰り返した。またPGEX-5/PGEX-3セット及びPGEX-5/ALS-RspAセットの場合には、上流部分にGCコンテンツが75%程度の領域があるので、上記の溶液に更に最終濃度が5%のDMSOを加えた。このPCRの結果、所望のインサートが挿入されていることを確認した。

#### 【0112】

所望のインサートの挿入が確認されたコロニー1点を取り、アンピシリン50ppmを含有するLB液体培地 (3 ml 10本) にて、 $37^\circ\text{C}$ で12時間振とう培養した。培養後、プラスミド抽出装置 (TOMY社製 DP-480) で培地からプラスミドを抽出 ( $400\sim 500\mu\text{l}$ 程度) した後、遠心濃縮により $200\mu\text{l}$ 程度まで濃縮した。その後、GFX PCR and Gel Purification Kitを用いて精製及び脱塩し、最後に $130\mu\text{l}$ 程度の滅菌水で溶出した。

#### 【0113】

これらのプラスミドをABI PRISM BigDye ver.2を用いてシーケンス反応を行

い、プラスミドに含まれるインサートの塩基配列を解析した。シーケンス反応に際して、反応溶液は、11  $\mu$ l の鋳型DNAと、1  $\mu$ l のプライマー (3.2 pmol/ $\mu$ l) と、8  $\mu$ l の pre-mix とを混合して調製し、総容量を 20  $\mu$ l とした。シーケンス反応条件としては、96°C で 5 分間の初期変性工程の後、96°C で 5 秒間の変性工程、50°C で 5 秒間のアニーリング工程及び 60°C で 4 分間の伸長工程からなるサイクルを 40 回繰り返し、最終サイクルの伸長工程は 60°C で 9 分間行うものとした。シーケンス反応終了後、AutoSeq G-50 column を用い反応液中の蛍光塩基をゲル濾過により除去し、ABI PRISM 310 DNA シーケンサーにより塩基配列を決定した。

## 【 0 1 1 4 】

なお、シーケンス反応に際しては、表 6 に記載したプライマーのうち、センスプライマーとして PGEX-5、ALS-RspC、ALS-Rsp3、ALS-Rsp1、3-1-4 及び ALS-Rsp B を用い、アンチセンスプライマーとして 4-83-3、PGEX-3、ALS-Rsp2、4-83-10 及び ALS-Rsp7 を用いた。

## 【 0 1 1 5 】

解析の結果、W548L 変異を有する変異 ALS 遺伝子を有する pGEX 2T ベクター (図 20 において、「pGEX 2T(ALS-W548L mutant)」と記載) 及び S627I 変異を有する変異型 ALS 遺伝子を有する pGEX 2T ベクター (図 20 において、「pGEX 2T(ALS-S627I mutant)」と記載) が得られたことを確認した。次いで、これら pGEX 2T(ALS-W548L mutant) 及び pGEX 2T(ALS-S627I mutant) で大腸菌を形質転換した。

## 【 0 1 1 6 】

【実施例 6】 Rb 系統のゲノム PCR により見い出された C512A (P171H) 変異及び Ga 系統のゲノム PCR により見い出された C514A (R172S) 変異をそれぞれ単独で持つ ALS cDNA の合成とこれを保持する pGEX 2T の作製ならびにこのベクターによる大腸菌の形質転換

まず、C512A (P171H) 及び C514A (R172S) のそれぞれの変異を単独で持つ ALS cDNA の合成とこれを保持する pGEX 2T の作製について、図 21 及び 22 を用いて説明する。

## 【 0 1 1 7 】

C512A (P171H) 変異 DNA 断片を得るため、Rb 系統のゲノム DNA を鋳型として、表

6 に記載したALS-Rsp6及びALS-Rsp4のプライマーセットを用いてPCRを行った。PCRはReady to Go PCR Beadsを用い、鋳型のゲノムDNAを5  $\mu$ l、各々のプライマー (25pmol/ $\mu$ l) を1  $\mu$ l加え、最終容量25  $\mu$ lで行った。反応条件としては、95℃で5分間の初期変性工程の後、95℃で30秒間の変性工程、55℃で1分間のアニーリング工程及び72℃で2分間の伸長工程からなるサイクルを40回繰り返し、最終サイクルの伸長工程を72℃で9分間行うものとした。

## 【0118】

PCR反応終了後、反応溶液を2 %アガロースゲルで電気泳動に供し、アガロースゲルからPCR生成物 (図21において「PCR-5」と記載) のバンドを切り出し、GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kitにより精製した。次に、精製したPCR+5をPCR産物クローニング用ベクター (TAクローニングベクター) であるpT7Blue T-vector (Novagen社製) に組み込んだ。すなわち、精製したPCR生成物1  $\mu$ lを、1  $\mu$ lのpT7Blue T-vector (50 ng/ $\mu$ l)、3  $\mu$ lの滅菌脱イオン水及び5  $\mu$ lのligation buffer (ver.2, I液, 宝酒造社製) と混合し、16℃で1晩反応させた。

## 【0119】

反応終了後、反応液全量が大腸菌 (JM109株) へ定法に従い形質転換した。アンピシリン50 ppmを含むLB固体培地上で培養後、実施例5と同様にして、出現したシングルコロニーから目的のシーケンスを有するもの選別した。選別したシングルコロニーを、アンピシリン50 ppmを含むLB液体培養液 (3 ml 10本) で、37℃で12時間振とう培養した。培養後、プラスミド抽出装置 (TOMY社製 DP-480) でプラスミドを抽出 (400~500  $\mu$ l) した。これを遠心濃縮により200  $\mu$ l程度まで濃縮して、GFX PCR and Gel Purification Kitで精製及び脱塩し、80  $\mu$ l程度の滅菌水で溶出した。

## 【0120】

次に、溶出液のうち50  $\mu$ lを、10  $\mu$ lの10 X T buffer及び10  $\mu$ lの0.1 %BSA存在下で、1  $\mu$ lのAcc I (12u/ $\mu$ l) 及び1  $\mu$ lのSma I (10u/ $\mu$ l) と混合し総量100  $\mu$ lとし、37℃で2時間インキュベートした。反応終了後、反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、目的のバンドを切り出して回収し、GFX PCR and Gel Purification Kitのプロトコルに従ってDNA断片を回収した。これにより、末端にSma Iサイ



トとACC Iサイトを有するC512A (P171H) 変異DNA断片を得た。

#### 【 0 1 2 1 】

一方、C514A変異及びC512A変異が近接しているため、Gb系統から抽出したゲノムDNAを鋳型としたPCRでは、C514A (R172S) 変異のみを有するDNA断片を得ることができない。したがって、図 2 1 に示すように、予め変異点を導入した一对のプライマーを用いることで、C514A (R172S) 変異のみを有するDNA断片を調製した。即ち、変異点の入ったプライマーとしてALS-M1 (5'-CCCCAGCCGCATGATCGGCACC GACGCCTT-3' : 配列番号 3 3、下線のAが変異点)とALS-M2 (5'-CGGTGCCGATCATGCGG CTGGGGACCT-3' : 配列番号 3 4、下線のTが変異点)を用い、野性型ALS cDNAが組み込まれたpBluescript II SK+を鋳型とし、ALS-Rsp6及びALS-M2のプライマーセットとALS-M1及びALS-Rsp4のプライマーセットとを用いてそれぞれPCRを行った。なお、ALS-M1における1～23番目の塩基配列とALS-M2における1～23番目の塩基配列とが相補的な部分である。ALS-Rsp6及びALS-M2のプライマーセットを用いた場合には図 2 1 中「PCR-6」と記載したDNA断片が増幅され、ALS-M1及びALS-Rsp4のプライマーセットを用いた場合には図 2 1 中「PCR-7」と記載したDNA断片が増幅される。

#### 【 0 1 2 2 】

PCRに際して、反応溶液は、1  $\mu$ lのLA Taq DNA polymerase (5units/ $\mu$ l、TAKARA社製)、10  $\mu$ lの10 X LA buffer、10  $\mu$ lの25 mM  $MgCl_2$ 、16  $\mu$ lのdNTPs (それぞれ25 mMのdATP、dGTP、dCTP及びdTTPからなる)、1  $\mu$ lの鋳型DNA、それぞれ4  $\mu$ lのセンスプライマー及びアンチセンスプライマー (それぞれ25 pmol/ $\mu$ l) を総量100  $\mu$ lに溶解したものを調製した。反応条件としては、95℃で5分間の初期変性工程の後、95℃で30秒間の変性工程、55℃で1分間のアニーリング工程及び72℃で2分間の伸長工程からなるサイクルを25回繰り返し、最終サイクルの伸長工程を72℃で9分間行うものとした。

#### 【 0 1 2 3 】

反応終了後、反応液を分取用1.5 %アガロースゲルで電気泳動に供し、目的の213 bp (PCR-6) と377 bp (PCR-7) のバンドを切り取り、GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kitにより精製した後、生成したDNA断片をそれぞれ100  $\mu$ lの滅

菌脱イオン水で溶出した。

【 0 1 2 4 】

次に、得られたPCR-6及びPCR-7を用いてSPRを行った。SPRに際して、反応液は、得られた溶出液のうち30  $\mu$ lを、1  $\mu$ lのLA Taq DNA polymerase (5units/ $\mu$ l)、10  $\mu$ lの10 X LA buffer、10  $\mu$ lの25mM MgCl<sub>2</sub>、16  $\mu$ lのdNTPs（それぞれ25mMのdATP、dGTP、dCTP及びdTTPからなる）と混合して総量100  $\mu$ lに調製した。SPR条件としては、95℃で5分間の初期変性工程の後、95℃で30秒間の変性工程、55℃で1分間のアニーリング工程及び72℃で2分間の伸長工程からなるサイクルを40回繰り返し、最終サイクルの伸長工程を72℃で9分間行うものとした。

【 0 1 2 5 】

反応終了後、反応液を分取用アガロースゲル(1.5%)電気泳動に供し、目的の560 bpのバンド（図21において「SPR-3」と記載）を切り出し、GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kitにより精製し、生成したDNA断片（SPR-3）を100  $\mu$ lの滅菌脱イオン水で溶出した。これを先に述べた方法と同様に、pT7Blue T-vectorに組み込み、大腸菌（JM109）に形質転換した。この大腸菌を培養し、抽出されたプラスミドをAcc IとSma Iで消化して、末端にSma IサイトとACC Iサイトを持つC514A（R172S）変異DNA断片を得た。

【 0 1 2 6 】

他方、野性型ALS遺伝子が組み込まれたプラスミド、pGEX-2T(ALS-wild)で形質転換された大腸菌(JM109株)を、アンピシリン50ppmを含むLB液体培地(2ml x 15本)にて37℃で1晩振とう培養した。プラスミド抽出装置（DP-480）でプラスミドを抽出後、抽出液（約750  $\mu$ l）を減圧遠心濃縮器で200  $\mu$ l程まで濃縮した。その後、GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kitにより脱塩し、最終的にプラスミドを200  $\mu$ lの滅菌脱イオン水で溶出した。

【 0 1 2 7 】

次に、得られたプラスミド、pGEX-2T(ALS-wild)をAcc Iで消化した。すなわち、溶出液のうち75  $\mu$ lを、9  $\mu$ lの10 X M buffer、3  $\mu$ lのAcc I (12u/ $\mu$ l) 及び3  $\mu$ lの滅菌脱イオン水と混合し、37℃で3時間反応した。反応終了後、反応液を1.5 %分取用アガロースゲル電気泳動に供し、目的のバンドを切り出して回収した。

後、GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kitにより精製し、最終的に100  $\mu$ lの滅菌脱イオン水でDNA断片を溶出した。

#### 【0128】

次に、Acc Iで消化されたpGEX-2T(ALS-wild)を、Sma Iで部分消化した。すなわち、溶出液のうち79  $\mu$ lを、10  $\mu$ lの10 X T buffer、10  $\mu$ lの0.1 % BSA、1  $\mu$ lのSma I(10 u/ $\mu$ l)と混合して総量100  $\mu$ lとし、30℃で1分間インキュベートした。なお、pGEX-2T(ALS-wild)には、3箇所のSma I認識配列 (pGEX-2TのThrombin切断サイトに隣接するマルチクローニングサイト上、ALS遺伝子276番目及び430番目)があるため、短時間で部分消化した。反応終了後、反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、ALS遺伝子430番目のSma I認識配列のみを消化したプラスミドに相当するバンドを切り出して回収し、GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kitを用いて酵素・タンパク質を除去して精製した。そして、最終的に滅菌脱イオン水50  $\mu$ lで溶出した。このAcc I消化/Sma I部分消化処理したpGEX-2T-野性型ALS cDNA断片と、上述の方法で得られた末端にSma IサイトとACC Iサイトを有するC512A (P171H) 変異DNA断片並びにC514A (R172S) 変異DNA断片を定法によりライゲーションした。なお、図22において、この方法により得られたC512A (P171H) 変異のみを単独で有する変異ALS遺伝子を含むプラスミドを「pGEX-2T(ALS P171H mutant)」と記載し、C514A (R172S) 変異のみを単独で有する変異ALS遺伝子を含むプラスミドを「pGEX-2T(ALS R172S mutant)」と記載する。

#### 【0129】

その後、反応液の全量を用いて大腸菌(JM109株)に形質転換し、アンピシリンを含むLB培地上で出現したシングルコロニーを、上述した方法と同様に、PCRによりスクリーニングし、pGEX-2T(ALS P171H mutant)で形質転換された大腸菌及びpGEX-2T(ALS R172S mutant)で形質転換された大腸菌を選抜した。

#### 【0130】

〔実施例7〕 C512A(P171H)/C514A(R172S)の2点変異型ALS cDNAの合成とこれを保持するpGEX-2Tの作製並びにこのベクターによる大腸菌の形質転換

C512A(P171H)/C514A(R172S)の2点変異型ALS cDNAの合成とこれを保持するpGEX-2Tの作製について、図23を用いて説明する。

## 【 0 1 3 1 】

C512A(P171H)/C514A(R172S)の2点変異型ALS cDNAの合成は、上述の実施例 6 に記載した方法に準じ、Ga系統から抽出したゲノムDNAを鋳型としたPCRで行った。すなわち、Ga系統から抽出したゲノムDNAを鋳型とし、ALS-Rsp6及びALS-Rsp4をプライマーセットとしてPCRを行い、図 2 3 中「PCR-8」と記載したDNA断片を増幅した。そして、増幅したDNA断片をpT7Blue T-vectorにライゲーションした後、これをAcc I及びSma Iで消化することによって、C512A(P171H)/C514A(R172S)変異DNA断片を得た。次に、図 2 2 に示したように、Acc I消化/Sma I部分消化処理したpGEX-2T-野性型ALS cDNA断片と、C512A(P171H)/C514A(R172S)変異DNAとを定法によりライゲーションした。これにより、pGEX-2T(ALS P171H,R172S mutant)を作製した。また、実施例 6 と同様にして、pGEX-2T(ALS P171H,R172S mutant)で形質転換された大腸菌を作製した。

## 【 0 1 3 2 】

〔実施例 8〕 C512A(P171H)/G1643T(W548L)及びC512A(P171H)/G1880T(S627I)の2点変異型ALS cDNAの合成とこれを保持するpGEX-2Tの作製並びにこのベクターによる大腸菌の形質転換

C512A(P171H)/G1643T(W548L)及びC512A(P171H)/G1880T(S627I)の2点変異型ALS cDNAの合成とこれを保持するpGEX-2Tの作製について、図 2 4 を用いて説明する。

## 【 0 1 3 3 】

まず、実施例 5 で得たpGEX 2T(ALS-W548L mutant)を、実施例 6 の方法に準じて、Acc Iで消化した後にSma Iで部分消化することによって、ALS遺伝子における430番目のSma I認識配列からAcc I認識配列までを欠失させる。次に、これと実施例 6 で作製したC512A(P171H)変異断片とをライゲーションすることによって、C512A(P171H)/G1643T(W548L)2点変異型ALS cDNAを含むプラスミド(図 2 4 中、「pGEX-2T(ALS-P171H,W548L mutant)」と記載)を作製した。

## 【 0 1 3 4 】

一方、pGEX 2T(ALS-W548L mutant)の代わりに、実施例 5 で得たpGEX 2T(ALS-S627I mutant)を用いることによって、同様にして、C512A(P171H)/G1880T(S627I)

2点変異型ALS cDNAを含むプラスミド（図24中、「pGEX-2T(ALS-P171H,S627I mutant)」と記載）を作製した。

さらに、これらpGEX-2T(ALS-P171H,W548L mutant)及びpGEX-2T(ALS-P171H,S627I mutant)を用いて、実施例6の方法と同様にして、大腸菌を形質転換した。

#### 【0135】

〔実施例9〕C512A(P171H)/G1643T(W548L)/G1880T(S627I)の3点変異型ALS cDNAの合成とこれを保持するpGEX-2Tの作製並びにこのベクターによる大腸菌の形質転換

C512A(P171H)/G1643T(W548L)/G1880T(S627I)の3点変異型ALS cDNAの合成とこれを保持するpGEX-2Tの作製について、図25を用いて説明する。

#### 【0136】

まず、実施例5で得たpGEX 2T(ALS-S627I mutant)をXho Iで消化した後、定法に従ってBAP処理を行う。次に、上述した方法に準じて、目的の遺伝子断片(ベクター側)をアガロースゲルから分離・精製した。また、実施例5で得たpGEX 2T(ALS-W548L mutant)をXho Iで消化し、上述した方法に準じて、当該変異を含む断片をアガロースゲルから分離・精製した。

#### 【0137】

次に、G1880T(S627I)とG1643T(W548L)の2点変異を併せ持つ「pGEX-2T(ALS-W548L,S627I mutant)」を作製する目的で、得られたDNA断片それぞれをライゲーション反応に供した。反応終了後、反応液全量を用いて大腸菌(JM109株)に形質転換し、アンピシリンを含むLB培地上で出現したシングルコロニーを、上述した方法に準じてPCRによりスクリーニングし、目的のプラスミド(pGEX-2T(ALS-W548L,S627I mutant))を持つ大腸菌を選抜した。

#### 【0138】

選抜した大腸菌を培養後、上述した方法に準じて、pGEX-2T(ALS-W548L,S627I mutant)を調製した。pGEX-2T(ALS-W548L,S627I mutant)をAcc I消化した後、Sma Iによる部分消化を行い、ALS遺伝子における430番目のSma I認識配列からAcc I認識配列までを欠失させたpGEX-2T(ALS-W548L,S627I mutant)を作製した。次に、これと実施例6で作製したC512A(P171H)変異断片とをライゲーションすること

によって、C512A(P171H)/G1643T(W548L)/G1880T(S627I)3点変異型ALS cDNAを含むプラスミド(図25中、「pGEX-2T(ALS-P171H,W548L,S627I mutant)と記載」)を作製した。

さらに、pGEX-2T(ALS-P171H,W548L,S627I mutant)を用いて、実施例6の方法と同様にして、大腸菌を形質転換した。

#### 【0139】

##### 〔実施例10〕変異型ALSタンパク質の発現

実施例3(5)で作製したpGEX-2T(ALS-wild)で形質転換した大腸菌、実施例5で作製したpGEX 2T(ALS-W548L mutant)で形質転換した大腸菌、実施例5で作製したpGEX 2T(ALS-S627I mutant)で形質転換した大腸菌、実施例6で作製したpGEX-2T(ALS P171H mutant)で形質転換された大腸菌、実施例6で作製したpGEX-2T(ALS R172S mutant)で形質転換された大腸菌、実施例7で作製したpGEX-2T(ALS P171H,R172S mutant)で形質転換された大腸菌、実施例8で作製したpGEX-2T(ALS-P171H,W548L mutant)で形質転換された大腸菌、実施例8で作製したpGEX-2T(ALS-P171H,S627I mutant)で形質転換された大腸菌及び実施例9で作製したpGEX-2T(ALS-P171H,W548L,S627I mutant)で形質転換された大腸菌を、2 mlのアンピシリンを含むLB液体培地にて27℃でそれぞれ振とう培養(前培養)した。この前培養液1 mlを用いて250 mlのアンピシリンを含むLB液体培地で、それぞれ本培養を行った。一晚培養後、1 mM IPTGを加えてさらに3時間~4時間培養することによって、GST融合タンパク質の発現誘導を行った。なお、菌体は洗浄後-80℃で保存した。

#### 【0140】

大腸菌からのALSの調製と精製は次の方法で行った。まず、-80℃に保存しておいた大腸菌のペレットを、ALS抽出緩衝液(30 %グリセロールと0.5 mM  $MgCl_2$ を含んだリン酸カリウム緩衝液pH 7.5)に懸濁した(培養液50 mlから得られたペレットに対して2.5 mlのALS抽出緩衝液を添加)。この懸濁液を超音波処理(Heat Systems-Ultrasonics社製、Sonicator W-225R、マイクロチップ、アウトプットコントロール8、約1秒インターバル、40秒2回)した後、4℃、15000×gで20分間遠心し、その上澄を粗酵素溶液とした。

## 【 0 1 4 1 】

これにより、GST融合野生型ALSタンパク質、GST融合W548L変異型ALSタンパク質、GST融合S627I変異型ALSタンパク質、GST融合P171H変異型ALSタンパク質、GST融合R172S変異型ALSタンパク質、GST融合P171H/R172S変異型ALSタンパク質、GST融合P171H/W548L変異型ALSタンパク質、GST融合P171H/S627I変異型ALSタンパク質及びGST融合P171H/W548L/S627I変異型ALSタンパク質のいずれかを含む9種類の粗酵素溶液を調製した。

## 【 0 1 4 2 】

## 〔実施例 1 1〕 変異型ALSタンパク質の薬剤感受性

実施例 1 0 で得た 9 種類の粗酵素溶液を用いて、野生型ALSタンパク質及び変異型ALSタンパク質の薬剤感受性を調べた。薬剤感受性試験は、実施例 2 とほぼ同様な手順に従って行った。ただし、本例においては、反応温度を37℃、反応時間を30分間とし、また大腸菌由来のALS活性を阻害するために、反応液には10 mMのバリンを添加した。また、薬剤には、PC除草剤としてbispyribac-sodium、pyrithiobac-sodium及びpyriminobacの3種類を使用し、スルホニルウレア系除草剤としてchlorsulfuronを使用し、イミダゾリノン系除草剤としてimazaquinを使用した。これら薬剤は、変異型ALSタンパク質を添加する前に、これらの薬剤の所定の濃度の溶液（bispyribac-sodiumとpyrithiobac-sodiumは水溶液、その他はアセトン溶液）を反応液中に添加した。アセトンの最終濃度は1 %とした。

## 【 0 1 4 3 】

9 種類の粗酵素溶液について、bispyribac-sodiumによる阻害活性を図 2 6 及び 2 7 並びに表 9 に示し、pyrithiobac-sodiumによる阻害活性を表 1 0 に示し、pyriminobacによる阻害活性を表 1 1 に示し、chlorsulfuronによる阻害活性を表 1 2 に示し、imazaquinによる阻害活性を表 1 3 に示した。

## 【 0 1 4 4 】

表 9 ～ 1 3 中、薬剤による阻害活性は、供試濃度において50 %阻害が得られる場合には、その50 %阻害を与える濃度（I50値）で表し、50 %阻害が得られない場合には供試濃度の最高濃度における阻害 %で表した。また、表 9 ～ 1 3 中、予想RS比とは、複数の変異を有する変異型ALSタンパク質について、単独で変異を

有する変異型ALSタンパク質のRS比から通常予測されるRS比を意味する。すなわち、予想RS比は、単独で変異を有する変異型ALSタンパク質のRS比から通常予測される相加効果を意味する。具体的には、複数の変異を有する変異型ALSタンパク質に関する予想RS比は、当該複数の変異のうちいずれか1つの変異のみ有する変異型ALSタンパク質のRS比を当該複数の変異全てについて選択し、選択したRS比を乗じることで算出した。複数の変異を有する変異型ALSタンパク質について実際のRS比が予想RS比を上回る場合、当該複数の変異を有する変異型ALSタンパク質は、変異を単独で有する変異型ALSタンパク質の組み合わせから予想される相加効果の抵抗性を超える抵抗性を有するものである。

【 0 1 4 5 】

【表 9】

ALS タンパク質の種類	I50 値 ( $\mu\text{M}$ )	RS 比	予想 RS 比	RS 比/予想 RS 比
野性型	0.0063			
P171H 変異型	0.055	8.7		
R172S 変異型	0.0062	0.98		
W548L 変異型	3.3	520		
S627I 変異型	0.26	41		
P171H/R172S 変異型	0.048	7.6	8.5	0.89
P171H/W548L 変異型	100 $\mu\text{M}$ で 5.5%	>15000	4500	>3.3
P171H/S627I 変異型	23	3700	360	10
P171H/W548L/S627I 変異型	100 $\mu\text{M}$ で 1.1%	>16000	190000	>0.084

【 0 1 4 6 】

【表 1 0】

ALS タンパク質の種類	I50 値 ( $\mu\text{M}$ )	RS 比	予想 RS 比	RS 比/予想 RS 比
野性型	0.011			
P171H 変異型	0.037	3.4		
R172S 変異型	0.011	1		
W548L 変異型	100 $\mu\text{M}$ で 41%	>9100		
S627I 変異型	2.2	200		
P171H/R172S 変異型	0.14	13	3.4	3.8
P171H/W548L 変異型	100 $\mu\text{M}$ で 20%	>9100	>31000	
P171H/S627I 変異型	9.4	850	680	1.3

【 0 1 4 7 】



【表 1 1】

ALS タンパク質の種類	I50 値 ( $\mu$ M)	RS 比	予想 RS 比	RS 比/予想 RS 比
野性型	0.008			
P171H 変異型	0.04	5		
R172S 変異型	0.0092	1.2		
W548L 変異型	36	4500		
S627I 変異型	22	2800		
P171H/R172S 変異型	0.041	5.1	6	0.85
P171H/W548L 変異型	100 $\mu$ M で 11%	>13000	23000	>0.57
P171H/S627I 変異型	100 $\mu$ M で 21%	>13000	14000	>0.93

【0 1 4 8】

【表 1 2】

ALS タンパク質の種類	I50 値 ( $\mu$ M)	RS 比	予想 RS 比	RS 比/予想 RS 比
野性型	0.013			
P171H 変異型	1.1	85		
R172S 変異型	0.011	0.85		
W548L 変異型	9.9	760		
S627I 変異型	0.031	2.4		
P171H/R172S 変異型	5.5	420	72	5.8
P171H/W548L 変異型	100 $\mu$ M で 16%	>7700	65000	>0.18
P171H/S627I 変異型	9.9	760	200	3.8
P171H/W548L/S627I 変異型	500 $\mu$ M で 30%	>38000	160000	>0.24

【0 1 4 9】

【表 1 3】

ALS タンパク質の種類	I50 値 ( $\mu$ M)	RS 比	予想 RS 比	RS 比/予想 RS 比
野性型	2.2			
P171H 変異型	3.4	1.5		
R172S 変異型	2.3	1		
W548L 変異型	100 $\mu$ M で 16%	>45		
S627I 変異型	15	6.8		
P171H/R172S 変異型	3.9	1.8	1.5	1.2
P171H/W548L 変異型	100 $\mu$ M で 13%	>45	>68	
P171H/S627I 変異型	71	32	10	3.2
P171H/W548L/S627I 変異型	100 $\mu$ M で 15%	>45	>460	

【0 1 5 0】

以上の表 9～13 のデータを順に説明する。

まず、bispyribac-sodium による阻害活性データ (表 9) からは次のことが明らかとなった。1 点変異型遺伝子がコードする変異型 ALS タンパク質 (P171H、R172S、W548L 及び S627I) の中では、W548L 変異型 ALS タンパク質が bispyribac-sodium に対して最も高い抵抗性を示した (RS 比が 520)。S627I 変異型 ALS タンパク質又

はP171H変異型ALSタンパク質も高い抵抗性を示した（それぞれ、RS比が41及び8.7）が、R172S変異型ALSタンパク質は野生型ALSタンパク質と同等の抵抗性しか示さなかった（RS比が0.98）。このことから、ALSタンパク質におけるP171H変異、W548L変異及びS627I変異は、bispyribac-sodiumに対する抵抗性を増強させるのに有効な変異であることが明らかとなった。また、ALSタンパク質におけるR172S変異は、サイレント変異であることが明らかとなった。

#### 【0151】

一方、2点変異型遺伝子がコードする変異型ALSタンパク質の中では、P171H/W548L変異型ALSタンパク質がbispyribac-sodiumに対して最も強い抵抗性を示した（100  $\mu$ Mで5.5%の阻害、RS比は>15000）。P171H/S627I変異型ALSタンパク質もbispyribac-sodiumに対して強い抵抗性を示した（RS比が3700）。P171H/R172S変異型ALSタンパク質の抵抗性の度合いは、P171H変異型ALSタンパク質とほぼ同じであった。また、3点変異型遺伝子によりコードされるP171H/W548L/S627I変異型ALSタンパク質もbispyribac-sodiumに対して強い抵抗性を与えた（100  $\mu$ Mで1.1%の阻害、RS比は>15000）。なお、これらの結果の元になった実際の薬剤用量応答結果は図26及び27に示した。

#### 【0152】

2点変異及び3点変異について、予想RS比と実際のRS比とを比較したところ、P171H/W548L変異型ALSタンパク質及びP171H/S627I変異型ALSタンパク質におけるRS比は、予想RS比を有意に上回っていた（RS比と予想RS比の比が1よりも明瞭に大きくなる）。このことから、これらの2つの2点変異型遺伝子（P171H/W548L変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子及びP171H/S627I変異型ALSタンパク質をコードする遺伝子）は、bispyribac-sodiumに対して、1点変異型遺伝子の抵抗性の度合いから予想されるよりも強い抵抗性をALSタンパク質に与えることが判明した。

#### 【0153】

次に、pyrithiobac-sodiumによる阻害活性（表10）からは次のことが明らかになった。1点変異型遺伝子がコードする変異型ALSタンパク質（P171H、R172S、W548L及びS627I）の中では、W548L変異型ALSタンパク質がpyrithiobac-sodiumに

対して最も強い抵抗性を示した（100  $\mu$ Mで41%、RS比は>9100）。S627I変異型ALSタンパク質も抵抗性を示した（RS比が200）が、P171H変異型ALSタンパク質の抵抗性の度合いは低く（RS比が3.4）、R172S変異型ALSタンパク質は野生型ALSタンパク質と同等の抵抗性しか示さなかった（RS比が0.85）。このことから、ALSタンパク質におけるP171H変異、W548L変異及びS627I変異は、Pyriethiobac-sodiumに対する抵抗性を増強させるのに有効な変異であることが明らかとなった。また、ALSタンパク質におけるR172S変異は、サイレント変異であることが明らかとなった。

#### 【0154】

一方、2点変異型遺伝子がコードする変異型ALSタンパク質で最も強い抵抗性を与えたのは、P171H/W548L変異型ALSタンパク質であり（100  $\mu$ Mで20%の阻害、RS比は>9100）、続いてP171H/S627I変異型ALSタンパク質であった（RS比が850）。表9に示したbispyribac-sodiumによる阻害活性データとは異なり、pyriethiobac-sodiumの場合、P171H/R172S変異型ALSタンパク質は、P171H変異型ALSタンパク質よりも高い度合いで抵抗性を示しており（RS比13）、単独ではサイレント変異であるR172S変異がP171H変異型ALSタンパク質の抵抗性の度合いを高めることが判明した。

#### 【0155】

また、2点変異型ALSタンパク質について、1点変異型ALSタンパク質のRS比から予想される予想RS比と実際のRS比と比較したところ、P171H/R172S変異型ALSタンパク質のRS比は予想RS比よりも有意に大きくなっていた（実際のRS比と予想RS比の比が1よりも明確に大きくなる）。このことから、P171H/R172S変異型ALSタンパク質は、pyriethiobac-sodiumに対して、1点変異型遺伝子の抵抗性の度合いから予想されるよりも強い抵抗性を示すことが判明した。

#### 【0156】

次に、pyriminobacによる阻害活性（表11）からは次のことが明らかになった。1点変異型遺伝子（P171H、R172S、W548L及びS627I）がコードする変異型ALSタンパク質の中では、W548L変異型ALSタンパク質がpyriminobacに対して最も強い抵抗性を示した（RS比4500）。S627I変異型ALSタンパク質も強い抵抗性を与え

たが (RS比2800)、P171H変異型ALSタンパク質の抵抗性の度合いは低く (RS比5)、R172S変異型ALSタンパク質は野生型ALSタンパク質と同等の抵抗性しか示さなかった (RS比1.2)。このことから、ALSタンパク質におけるP171H変異、W548L変異及びS627I変異は、pyriminobacに対する抵抗性を増強させるのに有効な変異であることが明らかとなった。また、ALSタンパク質におけるR172S変異は、サイレント変異であることが明らかとなった。

## 【 0 1 5 7 】

2点変異型遺伝子がコードする変異型ALSタンパク質で最も強い抵抗性を与えたのは、P171H/W548L変異型ALSタンパク質であり (100  $\mu$ Mで11%の阻害、RS比は>13000)、続いてP171H/S627I変異型ALSタンパク質であった (100  $\mu$ Mで21%の阻害、RS比は>13000)。これらP171H/W548L変異型ALSタンパク質及びP171H/S627I変異型ALSタンパク質について、予想RS比と実際のRS比とを比較した結果、1点変異型遺伝子の抵抗性の度合いから予想されるよりも強い抵抗性を示すかどうかを明確にすることはできなかった。

## 【 0 1 5 8 】

次に、chlorsulfuronによる阻害活性 (表 1 2) からは次のことが明らかになった。1点変異型遺伝子がコードする変異型ALSタンパク質 (P171H、R172S、W548L及びS627I) の中では、W548L変異型ALSタンパク質がchlorsulfuronに対して最も強い抵抗性を示した (RS比520)。P171H変異型ALSタンパク質も比較的強い抵抗性を示した (RS比85) が、S627I変異型ALSタンパク質の抵抗性の度合いは低く (RS比2.4)、R172S変異型ALSタンパク質は野生型ALSタンパク質と同等の抵抗性しか示さなかった (RS比0.85)。このことから、ALSタンパク質におけるP171H変異及びW548L変異は、chlorsulfuronに対する抵抗性を増強させるのに有効な変異であることが明らかとなった。また、ALSタンパク質におけるR172S変異は、サイレント変異であることが明らかとなった。

## 【 0 1 5 9 】

2点変異型遺伝子がコードする変異型ALSタンパク質で最も強い抵抗性を与えたのはP171H/W548L変異型ALSタンパク質であり (100  $\mu$ Mで16%の阻害、RS比は>7700)、続いてP171H/S627I変異型ALSタンパク質であった (RS比760)。表 9 に示し

た bispyribac-sodium による阻害活性データとは異なり、chlorsulfuron の場合、P171H/R172S 変異型 ALS タンパク質の抵抗性の度合い (RS 比 420) は P171H 変異型 ALS タンパク質よりも高い度合いで抵抗性を示しており、単独ではサイレント変異である R172S 変異が P171H 変異型 ALS タンパク質の抵抗性の度合いを高めることが判明した。また、P171H/W548L/S627I 変異型 ALS タンパク質も強い抵抗性を与えた ( $500\text{ }\mu\text{M}$  で 30% の阻害、RS 比は  $>3800$ )。

## 【0160】

P171H/R172S 変異型 ALS タンパク質及び P171H/S627I 変異型 ALS タンパク質について、予想 RS 比と実際の RS 比と比較したところ、ともに実際の RS 比は予想 RS 比よりも有意に大きくなっていた。このことから、P171H/R172S 変異型 ALS タンパク質及び P171H/S627I 変異型 ALS タンパク質は、chlorsulfuron に対して、1 点変異型遺伝子の抵抗性の度合いから予想されるよりも強い抵抗性を示すことが判明した。

## 【0161】

次に、Imazaquin による阻害活性データ (表 13) からは次のことが明らかとなった。1 点変異型遺伝子がコードする変異型 ALS タンパク質 (P171H、R172S、W548L 及び S627I) の中では、W548L 変異型 ALS タンパク質が imazaquin に対して最も強い抵抗性を示した ( $100\text{ }\mu\text{M}$  で 14%、RS 比は  $>45$ )。S627I 変異型 ALS タンパク質も抵抗性を示した (RS 比 41) が、P171H 変異型 ALS タンパク質はほとんど抵抗性を示さなかった (RS 比 1.5)。R172S 変異型 ALS タンパク質は、野生型 ALS タンパク質と同等の抵抗性しか示さなかった (RS 比 0.98)。このことから、ALS タンパク質における W548L 変異及び S627I 変異は、imazaquin に対する抵抗性を増強させるのに有効な変異であることが明らかとなった。また、ALS タンパク質における P171H 変異及び R172S 変異は、imazaquin に対してサイレント変異であることが明らかとなった。

## 【0162】

2 点変異型遺伝子で最も強い抵抗性を与えたのは P171H/W548L 変異型 ALS タンパク質であり ( $100\text{ }\mu\text{M}$  で 13% の阻害、RS 比は  $>45$ )、続いて P171H/S627I 変異型 ALS タンパク質であった (RS 比 32)。P171H/R172S 変異型 ALS タンパク質の抵抗性の度合いは P171H の 1 点変異遺伝子とほぼ同じであった。また、P171H/W548L/S627I 変

異型ALSタンパク質も強い抵抗性を与えた（100  $\mu$ Mで15%の阻害、RS比は $>45$ ）。

【0163】

これら2点変異型ALSタンパク質及び3点変異型ALSタンパク質について、予想RS比と実際のRS比とを比較した結果、P171H/S627I変異型ALSタンパク質のRS比は予想RS比よりも有意に大きくなっていた（実際のRS比と予想RS比の比が明瞭に1よりも大きくなる）。このことから、P171H/S627I変異型ALSタンパク質は、imazaquinに対して、1点変異型遺伝子の抵抗性の度合いから予想されるよりも強い抵抗性を示すことが判明した。

【0164】

【発明の効果】

以上、詳細に説明したように、本発明によれば、様々な除草剤に対して優れた抵抗性を示すアセト乳酸シンターゼをコードする遺伝子、該遺伝子によりコードされるアセト乳酸シンターゼタンパク質、該遺伝子を有する組換えベクター、該組換えベクターを有する形質転換体、該遺伝子を有する植物、該植物の育成方法及び、該遺伝子を選択マーカーとして使用する形質転換細胞を選択する方法を提供することができる。

【0165】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KUMIAI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD

National Institute of Agrobiological Sciences

<120> A gene coding for aceto-lactate-synthetase

<130> P02-0048

<140>

<141>

&lt;160&gt; 34

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2301

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza sativa var. kinmaze

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (48)..(1979)

&lt;400&gt; 1

cccaaaccga gaaaccctcg ccgccgccgc cgccgccacc acccacc atg gct acg 56

Met Ala Thr

1

acc gcc gcg gcc gcg gcc gcc gcc ctg tcc gcc gcc gcg acg gcc aag 104

Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ser Ala Ala Ala Thr Ala Lys

5

10

15

acc ggc cgt aag aac cac cag cga cac cac gtc ctt ccc gct cga ggc 152

Thr Gly Arg Lys Asn His Gln Arg His His Val Leu Pro Ala Arg Gly

20

25

30

35

cgg gtg ggg gcg gcg gcg gtc agg tgc tgc gcg gtg tcc ccg gtc acc 200

Arg Val Gly Ala Ala Ala Val Arg Cys Ser Ala Val Ser Pro Val Thr

40

45

50

ccg ccg tcc ccg gcg ccg ccg gcc acg ccg ctc cgg ccg tgg ggg ccg 248

Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu Arg Pro Trp Gly Pro

55

60

65

gcc gag ccc cgc aag ggc gcg gac atc ctc gtg gag gcg ctg gag cgg 296

Ala Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg

70

75

80

tgc ggc gtc agc gac gtg ttc gcc tac ccg ggc ggc gcg tcc atg gag 344

Cys Gly Val Ser Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu

85

90

95

atc cac cag gcg ctg acg cgc tcc ccg gtc atc acc aac cac ctc ttc 392

Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile Thr Asn His Leu Phe

100

105

110

115

cgc cac gag cag ggc gag gcg ttc gcg gcg tcc ggg tac gcg cgc gcg 440

Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Arg Ala

120

125

130

tcc ggc cgc gtc ggg gtc tgc gtc gcc acc tcc ggc ccc ggg gca acc 488

Ser Gly Arg Val Gly Val Cys Val Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr

135

140

145

aac ctc gtg tcc gcg ctc gcc gac gcg ctg ctc gac tcc gtc ccg atg 536

Asn Leu Val Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Met

150

155

160



gtc gcc atc acg ggc cag gtc cac agc cgc atg atc ggc acc gac gcc 584

Val Ala Ile Thr Gly Gln Val His Ser Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala

165

170

175

ttc cag gag acg ccc ata gtc gag gtc acc cgc tcc atc acc aag cac 632

Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His

180

185

190

195

aat tac ctt gtc ctt gat gtg gag gac atc ccc cgc gtc ata cag gaa 680

Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Val Ile Gln Glu

200

205

210

gcc ttc ttc ctc gcg tcc tcg ggc cgt cct ggc ccg gtg ctg gtc gac 728

Ala Phe Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp

215

220

225

atc ccc aag gac atc cag cag cag atg gcc gtg ccg gtc tgg gac acc 776

Ile Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val Pro Val Trp Asp Thr

230

235

240

tcg atg aat cta cca ggg tac atc gca cgc ctg ccc aag cca ccc gcg 824

Ser Met Asn Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys Pro Pro Ala

245

250

255

aca gaa ttg ctt gag cag gtc ttg cgt ctg gtt ggc gag tca cgg cgc 872

Thr Glu Leu Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu Ser Arg Arg

260

265

270

275

ccg att ctc tat gtc ggt ggt ggc tgc tct gca tct ggt gac gaa ttg 920  
 Pro Ile Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ser Ala Ser Gly Asp Glu Leu  
 280 285 290

cgc tgg ttt gtt gag ctg act ggt atc cca gtt aca acc. act ctg atg 968  
 Arg Trp Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr Thr Leu Met  
 295 300 305

ggc ctc ggc aat ttc ccc agt gac gac ccg ttg tcc ctg cgc atg ctt 1016  
 Gly Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu Arg Met Leu  
 310 315 320

ggg atg cat ggc acg gtg tac gca aat tat gcc gtg gat aag gct gac 1064  
 Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp  
 325 330 335

ctg ttg ctt gcg ttt ggt gtg cgg ttt gat gat cgt gtg aca ggg aaa 1112  
 Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys  
 340 345 350 355

att gag gct ttt gca agc agg gcc aag att gtg cac att gac att gat 1160  
 Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp  
 360 365 370

cca gca gag att gga aag aac aag caa cca cat gtg tca att tgc gca 1208  
 Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala  
 375 380 385

gat gtt aag ctt gct tta cag ggc ttg aat gct ctg cta caa cag agc 1256

Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Leu Asn Ala Leu Leu Gln Gln Ser

390

395

400

aca aca aag aca agt tct gat ttt agt gca tgg cac aat gag ttg gac 1304

Thr Thr Lys Thr Ser Ser Asp Phe Ser Ala Trp His Asn Glu Leu Asp

405

410

415

cag cag aag agg gag ttt cct ctg ggg tac aaa act ttt ggt gaa gag 1352

Gln Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Phe Gly Glu Glu

420

425

430

435

atc cca ccg caa tat gcc att cag gtg ctg gat gag ctg acg aaa ggt 1400

Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu Thr Lys Gly

440

445

450

gag gca atc atc gct act ggt gtt ggg cag cac cag atg tgg gcg gca 1448

Glu Ala Ile Ile Ala Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala

455

460

465

caa tat tac acc tac aag cgg cca cgg cag tgg ctg tct tcg gct ggt 1496

Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser Ser Ala Gly

470

475

480

ctg ggc gca atg gga ttt ggg ctg cct gct gca gct ggt gct tct gtg 1544

Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly Ala Ser Val

485

490

495

gct aac cca ggt gtc aca gtt gtt gat att gat ggg gat ggt agc ttc 1592

Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe

500	505	510	515
ctc atg aac att cag gag ctg gca ttg atc cgc att gag aac ctc cct 1640			
Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Leu Ile Arg Ile Glu Asn Leu Pro			
520	525	530	
gtg aag gtg atg gtg ttg aac aac caa cat ttg ggt atg gtg gtg caa 1688			
Val Lys Val Met Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Val Gln			
535	540	545	
tgg gag gat agg ttt tac aag gcg aat agg gcg cat aca tac ttg ggc 1736			
Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly			
550	555	560	
aac ccg gaa tgt gag agc gag ata tat cca gat ttt gtg act att gct 1784			
Asn Pro Glu Cys Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val Thr Ile Ala			
565	570	575	
aag ggg ttc aat att cct gca gtc cgt gta aca aag aag agt gaa gtc 1832			
Lys Gly Phe Asn Ile Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys Ser Glu Val			
580	585	590	595
cgt gcc gcc atc aag aag atg ctc gag act cca ggg cca tac ttg ttg 1880			
Arg Ala Ala Ile Lys Lys Met Leu Glu Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu			
600	605	610	
gat atc atc gtc ccg cac cag gag cat gtg ctg cct atg atc cca agt 1928			
Asp Ile Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser			
615	620	625	

ggg ggc gca ttc aag gac atg atc ctg gat ggt gat ggc agg act gtg 1976

Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly Arg Thr Val

630

635

640

tat taatctataa tctgtatggt ggcaaagcac cagcccggcc tatgtttgac 2029

Tyr

ctgaatgacc cataaagagt ggtatgccta tgatgtttgt atgtgctcta tcaataacta 2089

aggtgtcaac tatgaaccat atgctcttct gttttacttg tttgatgtgc ttggcatggt 2149

aatcctaatt agcttcctgc tgtctagggt tgtagtgtgt tgttttctgt aggcatatgc 2209

atcacaagat atcatgtaag tttcttgtcc tacatatcaa taataagaga ataaagtact 2269

tctatgcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 2301

<210> 2

<211> 644

<212> PRT

<213> Oryza sativa var. kinmaze

<400> 2

Met Ala Thr Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ser Ala Ala Ala

1

5

10

15

Thr Ala Lys Thr Gly Arg Lys Asn His Gln Arg His His Val Leu Pro

20

25

30

Ala Arg Gly Arg Val Gly Ala Ala Ala Val Arg Cys Ser Ala Val Ser

35

40

45

Pro Val Thr Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu Arg Pro

50

55

60

Trp Gly Pro Ala Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala

65

70

75

80

Leu Glu Arg Cys Gly Val Ser Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala

85

90

95

Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile Thr Asn

100

105

110

His Leu Phe Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr

115

120

125

Ala Arg Ala Ser Gly Arg Val Gly Val Cys Val Ala Thr Ser Gly Pro

130

135

140

Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser

145

150

155

160

Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val His Ser Arg Met Ile Gly

165

170

175

Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile  
180 185 190

Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Val  
195 200 205

Ile Gln Glu Ala Phe Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val  
210 215 220

Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val Pro Val  
225 230 235 240

Trp Asp Thr Ser Met Asn Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys  
245 250 255

Pro Pro Ala Thr Glu Leu Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu  
260 265 270

Ser Arg Arg Pro Ile Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ser Ala Ser Gly  
275 280 285

Asp Glu Leu Arg Trp Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr  
290 295 300

Thr Leu Met Gly Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu  
305 310 315 320

Arg Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp  
325 330 335

Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val

340

345

350

Thr Gly Lys Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile

355

360

365

Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser

370

375

380

Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Leu Asn Ala Leu Leu

385

390

395

400

Gln Gln Ser Thr Thr Lys Thr Ser Ser Asp Phe Ser Ala Trp His Asn

405

410

415

Glu Leu Asp Gln Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Phe

420

425

430

Gly Glu Glu Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu

435

440

445

Thr Lys Gly Glu Ala Ile Ile Ala Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met

450

455

460

Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser

465

470

475

480

Ser Ala Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly



485

490

495

Ala Ser Val Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp

500

505

510

Gly Ser Phe Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Leu Ile Arg Ile Glu

515

520

525

Asn Leu Pro Val Lys Val Met Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met

530

535

540

Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr

545

550

555

560

Tyr Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val

565

570

575

Thr Ile Ala Lys Gly Phe Asn Ile Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys

580

585

590

Ser Glu Val Arg Ala Ala Ile Lys Lys Met Leu Glu Thr Pro Gly Pro

595

600

605

Tyr Leu Leu Asp Ile Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met

610

615

620

Ile Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly

625

630

635

640

Arg Thr Val Tyr

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 2300

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza sativa var. kinmaze

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (48)..(1979)

&lt;400&gt; 3

cccaaaccga gaaaccctcg ccgcccgcgc cgccgccacc acccacc atg gct acg 56

Met Ala Thr

1

acc gcc gcg gcc gcg gcc gcc gcc ctg tcc gcc gcc gcg acg gcc aag 104

Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ser Ala Ala Ala Thr Ala Lys

5

10

15

acc ggc cgt aag aac cac cag cga cac cac gtc ctt ccc gct cga ggc 152

Thr Gly Arg Lys Asn His Gln Arg His His Val Leu Pro Ala Arg Gly

20

25

30

35

cgg gtg ggg gcg gcg gcg gtc agg tgc tcg gcg gtg tcc ccg gtc acc 200

Arg Val Gly Ala Ala Ala Val Arg Cys Ser Ala Val Ser Pro Val Thr

40

45

50

ccg ccg tcc ccg gcg ccg ccg gcc acg ccg ctc cgg ccg tgg ggg ccg 248

Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu Arg Pro Trp Gly Pro

55

60

65

gcc gag ccc cgc aag ggc gcg gac atc ctc gtg gag gcg ctg gag cgg 296

Ala Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg

70

75

80

tgc ggc gtc agc gac gtg ttc gcc tac ccg ggc ggc gcg tcc atg gag 344

Cys Gly Val Ser Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu

85

90

95

atc cac cag gcg ctg acg cgc tcc ccg gtc atc acc aac cac ctc ttc 392

Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile Thr Asn His Leu Phe

100

105

110

115

cgc cac gag cag ggc gag gcg ttc gcg gcg tcc ggg tac gcg cgc gcg 440

Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Arg Ala

120

125

130

tcc ggc cgc gtc ggg gtc tgc gtc gcc acc tcc ggc ccc ggg gca acc 488

Ser Gly Arg Val Gly Val Cys Val Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr

135

140

145

aac ctc gtg tcc gcg ctc gcc gac gcg ctg ctc gac tcc gtc ccg atg 536

Asn Leu Val Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Met

150

155

160

gtc gcc atc acg ggc cag gtc cac cgc cgc atg atc ggc acc gac gcc 584  
 Val Ala Ile Thr Gly Gln Val His Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala

165

170

175

ttc cag gag acg ccc ata gtc gag gtc acc cgc tcc atc acc aag cac 632  
 Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His

180

185

190

195

aat tac ctt gtc ctt gat gtg gag gac atc ccc cgc gtc ata cag gaa 680  
 Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Val Ile Gln Glu

200

205

210

gcc ttc ttc ctc gcg tcc tcg ggc cgt cct ggc ccg gtg ctg gtc gac 728  
 Ala Phe Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp

215

220

225

atc ccc aag gac atc cag cag cag atg gcc gtg ccg gtc tgg gac acc 776  
 Ile Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val Pro Val Trp Asp Thr

230

235

240

tcg atg aat cta cca ggg tac atc gca cgc ctg ccc aag cca ccc gcg 824  
 Ser Met Asn Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys Pro Pro Ala

245

250

255

aca gaa ttg ctt gag cag gtc ttg cgt ctg gtt ggc gag tca cgg cgc 872  
 Thr Glu Leu Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu Ser Arg Arg

260

265

270

275

ccg att ctc tat gtc ggt ggt ggc tgc tct gca tct ggt gac gaa ttg 920

Pro Ile Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ser Ala Ser Gly Asp Glu Leu

280

285

290

cgc tgg ttt gtt gag ctg act ggt atc cca gtt aca acc act ctg atg 968

Arg Trp Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr Thr Leu Met

295

300

305

ggc ctc ggc aat ttc ccc agt gac gac ccg ttg tcc ctg cgc atg ctt 1016

Gly Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu Arg Met Leu

310

315

320

ggg atg cat ggc acg gtg tac gca aat tat gcc gtg gat aag gct gac 1064

Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp

325

330

335

ctg ttg ctt gcg ttt ggt gtg cgg ttt gat gat cgt gtg aca ggg aaa 1112

Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys

340

345

350

355

att gag gct ttt gca agc agg gcc aag att gtg cac att gac att gat 1160

Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp

360

365

370

cca gca gag att gga aag aac aag caa cca cat gtg tca att tgc gca 1208

Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala

375

380

385

gat gtt aag ctt gct tta cag ggc ttg aat gct ctg cta caa cag agc 1256

Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Leu Asn Ala Leu Leu Gln Gln Ser

390

395

400

aca aca aag aca agt tct gat ttt agt gca tgg cac aat gag ttg gac 1304

Thr Thr Lys Thr Ser Ser Asp Phe Ser Ala Trp His Asn Glu Leu Asp

405

410

415

cag cag aag agg gag ttt cct ctg ggg tac aaa act ttt ggt gaa gag 1352

Gln Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Phe Gly Glu Glu

420

425

430

435

atc cca ccg caa tat gcc att cag gtg ctg gat gag ctg acg aaa ggt 1400

Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu Thr Lys Gly

440

445

450

gag gca atc atc gct act ggt gtt ggg cag cac cag atg tgg gcg gca 1448

Glu Ala Ile Ile Ala Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala

455

460

465

caa tat tac acc tac aag cgg cca cgg cag tgg ctg tct tcg gct ggt 1496

Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser Ser Ala Gly

470

475

480

ctg ggc gca atg gga ttt ggg ctg cct gct gca gct ggt gct tct gtg 1544

Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly Ala Ser Val

485

490

495

gct aac cca ggt gtc aca gtt gtt gat att gat ggg gat ggt agc ttc 1592

Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe

500

505

510

515

ctc atg aac att cag gag ctg gca ttg atc cgc att gag aac ctc cct 1640

Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Leu Ile Arg Ile Glu Asn Leu Pro

520

525

530

gtg aag gtg atg gtg ttg aac aac caa cat ttg ggt atg gtg gtg caa 1688

Val Lys Val Met Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Val Gln

535

540

545

ttg gag gat agg ttt tac aag gcg aat agg gcg cat aca tac ttg ggc 1736

Leu Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly

550

555

560

aac ccg gaa tgt gag agc gag ata tat cca gat ttt gtg act att gct 1784

Asn Pro Glu Cys Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val Thr Ile Ala

565

570

575

aag ggg ttc aat att cct gca gtc cgt gta aca aag aag agt gaa gtc 1832

Lys Gly Phe Asn Ile Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys Ser Glu Val

580

585

590

595

cgt gcc gcc atc aag aag atg ctc gag act cca ggg cca tac ttg ttg 1880

Arg Ala Ala Ile Lys Lys Met Leu Glu Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu

600

605

610

gat atc atc gtc ccg cac cag gag cat gtg ctg cct atg atc cca agt 1928

Asp Ile Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Ser

615

620

625

ggg ggc gca ttc aag gac atg atc ctg gat ggt gat ggc agg act gtg 1976

Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly Arg Thr Val

630

635

640

tat taatctataa tctgtatggt ggcaaagcac cagcccggcc tatgtttgac 2029

Tyr

ctgaatgacc cataaagagt ggtatgccta tgatgtttgt atgtgctcta tcaataacta 2089

aggtgtcaac tatgaaccat atgctcttct gttttacttg tttgatgtgc ttggcatggt 2149

aatcctaatt agcttcctgc tgtctagggt tgtagtgtgt tgttttctgt aggcatatgc 2209

atcacaagat atcatgtaag tttcttgtcc tacatatcaa taataagaga ataaagtact 2269

tctatgcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 2300

<210> 4

<211> 644

<212> PRT

<213> Oryza sativa var. kinmaze

<400> 4

Met Ala Thr Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ser Ala Ala Ala

1

5

10

15

Thr Ala Lys Thr Gly Arg Lys Asn His Gln Arg His His Val Leu Pro

20

25

30



Ala Arg Gly Arg Val Gly Ala Ala Ala Val Arg Cys Ser Ala Val Ser

35

40

45

Pro Val Thr Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu Arg Pro

50

55

60

Trp Gly Pro Ala Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala

65

70

75

80

Leu Glu Arg Cys Gly Val Ser Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala

85

90

95

Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile Thr Asn

100

105

110

His Leu Phe Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr

115

120

125

Ala Arg Ala Ser Gly Arg Val Gly Val Cys Val Ala Thr Ser Gly Pro

130

135

140

Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser

145

150

155

160

Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val His Arg Arg Met Ile Gly

165

170

175

Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile

180

185

190

Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Val

195

200

205

Ile Gln Glu Ala Phe Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val

210

215

220

Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val Pro Val

225

230

235

240

Trp Asp Thr Ser Met Asn Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys

245

250

255

Pro Pro Ala Thr Glu Leu Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu

260

265

270

Ser Arg Arg Pro Ile Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ser Ala Ser Gly

275

280

285

Asp Glu Leu Arg Trp Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr

290

295

300

Thr Leu Met Gly Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu

305

310

315

320

Arg Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp

325

330

335

Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val

340

345

350

Thr Gly Lys Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile

355

360

365

Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser

370

375

380

Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Leu Asn Ala Leu Leu

385

390

395

400

Gln Gln Ser Thr Thr Lys Thr Ser Ser Asp Phe Ser Ala Trp His Asn

405

410

415

Glu Leu Asp Gln Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Phe

420

425

430

Gly Glu Glu Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu

435

440

445

Thr Lys Gly Glu Ala Ile Ile Ala Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met

450

455

460

Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser

465

470

475

480

Ser Ala Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly

485

490

495

Ala Ser Val Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp

500

505

510

Gly Ser Phe Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Leu Ile Arg Ile Glu

515

520

525

Asn Leu Pro Val Lys Val Met Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met

530

535

540

Val Val Gln Leu Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr

545

550

555

560

Tyr Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val

565

570

575

Thr Ile Ala Lys Gly Phe Asn Ile Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys

580

585

590

Ser Glu Val Arg Ala Ala Ile Lys Lys Met Leu Glu Thr Pro Gly Pro

595

600

605

Tyr Leu Leu Asp Ile Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met

610

615

620

Ile Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly

625

630

635

640

Arg Thr Val Tyr

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 2294

&lt;212&gt; DNA

<213> *Oryza sativa* var. kinmaze

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (48)..(1979)

&lt;400&gt; 5

cccaaaccga gaaaccctcg ccgccgccgc cgccgccacc acccacc atg gct acg 56

Met Ala Thr

1

acc gcc gcg gcc gcg gcc gcc gcc ctg tcc gcc gcc gcg acg gcc aag 104

Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ser Ala Ala Ala Thr Ala Lys

5

10

15

acc. ggc cgt aag aac cac cag cga cac cac gtc ctt ccc gct cga ggc 152

Thr Gly Arg Lys Asn His Gln Arg His His Val Leu Pro Ala Arg Gly

20

25

30

35

cgg gtg ggg gcg gcg gcg gtc agg tgc tcg gcg gtg tcc ccg gtc acc 200

Arg Val Gly Ala Ala Ala Val Arg Cys Ser Ala Val Ser Pro Val Thr

40

45

50

ccg ccg tcc ccg gcg ccg ccg gcc acg ccg ctc cgg ccg tgg ggg ccg 248  
 Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu Arg Pro Trp Gly Pro  
 55 60 65

gcc gag ccc cgc aag ggc gcg gac atc ctc gtg gag gcg ctg gag cgg 296  
 Ala Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg  
 70 75 80

tgc ggc gtc agc gac gtg ttc gcc tac ccg ggc ggc gcg tcc atg gag 344  
 Cys Gly Val Ser Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu  
 85 90 95

atc cac cag gcg ctg acg cgc tcc ccg gtc atc acc aac cac ctc ttc 392  
 Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile Thr Asn His Leu Phe  
 100 105 110 115

cgc cac gag cag ggc gag gcg ttc gcg gcg tcc ggg tac gcg cgc gcg 440  
 Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Arg Ala  
 120 125 130

tcc ggc cgc gtc ggg gtc tgc gtc gcc acc tcc ggc ccc ggg gca acc 488  
 Ser Gly Arg Val Gly Val Cys Val Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr  
 135 140 145

aac ctc gtg tcc gcg ctc gcc gac gcg ctg ctc gac tcc gtc ccg atg 536  
 Asn Leu Val Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Met  
 150 155 160

gtc gcc atc acg ggc cag gtc cac cgc cgc atg atc ggc acc gac gcc 584

Val Ala Ile Thr Gly Gln Val His Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala

165

170

175

ttc cag gag acg ccc ata gtc gag gtc acc cgc tcc atc acc aag cac 632

Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His

180

185

190

195

aat tac ctt gtc ctt gat gtg gag gac atc ccc cgc gtc ata cag gaa 680

Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Val Ile Gln Glu

200

205

210

gcc ttc ttc ctc gcg tcc tcg ggc cgt cct ggc ccg gtg ctg gtc gac 728

Ala Phe Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp

215

220

225

atc ccc aag gac atc cag cag cag atg gcc gtg ccg gtc tgg gac acc 776

Ile Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val Pro Val Trp Asp Thr

230

235

240

tcg atg aat cta cca ggg tac atc gca cgc ctg ccc aag cca ccc gcg 824

Ser Met Asn Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys Pro Pro Ala

245

250

255

aca gaa ttg ctt gag cag gtc ttg cgt ctg gtt ggc gag tca cgg cgc 872

Thr Glu Leu Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu Ser Arg Arg

260

265

270

275

ccg att ctc tat gtc ggt ggt ggc tgc tct gca tct ggt gac gaa ttg 920

Pro Ile Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ser Ala Ser Gly Asp Glu Leu

280	285	290	
cgc tgg ttt gtt gag ctg act ggt atc cca gtt aca acc act ctg atg			968
Arg Trp Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr Thr Leu Met			
295	300	305	
ggc ctc ggc aat ttc ccc agt gac gac ccg ttg tcc ctg cgc atg ctt			1016
Gly Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu Arg Met Leu			
310	315	320	
ggg atg cat ggc acg gtg tac gca aat tat gcc gtg gat aag gct gac			1064
Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp			
325	330	335	
ctg ttg ctt gcg ttt ggt gtg cgg ttt gat gat cgt gtg aca ggg aaa			1112
Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys			
340	345	350	355
att gag gct ttt gca agc agg gcc aag att gtg cac att gac att gat			1160
Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp			
360	365	370	
cca gca gag att gga aag aac aag caa cca cat gtg tca att tgc gca			1208
Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala			
375	380	385	
gat gtt aag ctt gct tta cag ggc ttg aat gct ctg cta caa cag agc			1256
Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Leu Asn Ala Leu Leu Gln Gln Ser			
390	395	400	



aca aca aag aca agt tct gat ttt agt gca tgg cac aat gag ttg gac 1304

Thr Thr Lys Thr Ser Ser Asp Phe Ser Ala Trp His Asn Glu Leu Asp

405

410

415

cag cag aag agg gag ttt cct ctg ggg tac aaa act ttt ggt gaa gag 1352

Gln Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Phe Gly Glu Glu

420

425

430

435

atc cca ccg caa tat gcc att cag gtg ctg gat gag ctg acg aaa ggt 1400

Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu Thr Lys Gly

440

445

450

gag gca atc atc gct act ggt gtt ggg cag cac cag atg tgg gcg gca 1448

Glu Ala Ile Ile Ala Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala

455

460

465

caa tat tac acc tac aag cgg cca cgg cag tgg ctg tct tcg gct ggt 1496

Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser Ser Ala Gly

470

475

480

ctg ggc gca atg gga ttt ggg ctg cct gct gca gct ggt gct tct gtg 1544

Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly Ala Ser Val

485

490

495

gct aac cca ggt gtc aca gtt gtt gat att gat ggg gat ggt agc ttc 1592

Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe

500

505

510

515

ctc atg aac att cag gag ctg gca ttg atc cgc att gag aac ctc cct 1640  
Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Leu Ile Arg Ile Glu Asn Leu Pro

520

525

530

gtg aag gtg atg gtg ttg aac aac caa cat ttg ggt atg gtg gtg caa 1688  
Val Lys Val Met Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Val Gln

535

540

545

tgg gag gat agg ttt tac aag gcg aat agg gcg cat aca tac ttg ggc 1736  
Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly

550

555

560

aac ccg gaa tgt gag agc gag ata tat cca gat ttt gtg act att gct 1784  
Asn Pro Glu Cys Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val Thr Ile Ala

565

570

575

aag ggg ttc aat att cct gca gtc cgt gta aca aag aag agt gaa gtc 1832  
Lys Gly Phe Asn Ile Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys Ser Glu Val

580

585

590

595

cgt gcc gcc atc aag aag atg ctc gag act cca ggg cca tac ttg ttg 1880  
Arg Ala Ala Ile Lys Lys Met Leu Glu Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu

600

605

610

gat atc atc gtc ccg cac cag gag cat gtg ctg cct atg atc cca att 1928  
Asp Ile Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Ile

615

620

625

ggg ggc gca ttc aag gac atg atc ctg gat ggt gat ggc agg act gtg 1976

Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly Arg Thr Val

630

635

640

tat taatctataa tctgtatgtt ggcaaagcac cagcccggcc tatgtttgac 2029

Tyr

ctgaatgacc cataaagagt ggtatgccta tgatgtttgt atgtgctcta tcaataacta 2089

agggtcaac tatgaacat atgctcttct gttttacttg tttgatgtgc ttggcatggt 2149

aatcctaatt agcttcctgc tgtctagggt tgtagtgtgt tgttttctgt aggcatatgc 2209

atcacaagat atcatgtaag tttcttgtcc tacatatcaa taataagaga ataaagtact 2269

tctatgtaaa aaaaaaaaaa aaaaa 2294

<210> 6

<211> 644

<212> PRT

<213> Oryza sativa var. kinmaze

<400> 6

Met Ala Thr Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ser Ala Ala Ala

1

5

10

15

Thr Ala Lys Thr Gly Arg Lys Asn His Gln Arg His His Val Leu Pro

20

25

30

Ala Arg Gly Arg Val Gly Ala Ala Ala Val Arg Cys Ser Ala Val Ser

35

40

45

Pro Val Thr Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu Arg Pro

50

55

60

Trp Gly Pro Ala Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala

65

70

75

80

Leu Glu Arg Cys Gly Val Ser Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala

85

90

95

Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile Thr Asn

100

105

110

His Leu Phe Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr

115

120

125

Ala Arg Ala Ser Gly Arg Val Gly Val Cys Val Ala Thr Ser Gly Pro

130

135

140

Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser

145

150

155

160

Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val His Arg Arg Met Ile Gly

165

170

175

Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile

180

185

190

Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Val  
195 200 205

Ile Gln Glu Ala Phe Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val  
210 215 220

Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val Pro Val  
225 230 235 240

Trp Asp Thr Ser Met Asn Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys  
245 250 255

Pro Pro Ala Thr Glu Leu Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu  
260 265 270

Ser Arg Arg Pro Ile Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ser Ala Ser Gly  
275 280 285

Asp Glu Leu Arg Trp Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr  
290 295 300

Thr Leu Met Gly Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu  
305 310 315 320

Arg Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp  
325 330 335

Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val

340

345

350

Thr Gly Lys Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile

355

360

365

Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser

370

375

380

Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Leu Asn Ala Leu Leu

385

390

395

400

Gln Gln Ser Thr Thr Lys Thr Ser Ser Asp Phe Ser Ala Trp His Asn

405

410

415

Glu Leu Asp Gln Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Phe

420

425

430

Gly Glu Glu Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu

435

440

445

Thr Lys Gly Glu Ala Ile Ile Ala Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met

450

455

460

Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser

465

470

475

480

Ser Ala Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly

485

490

495

Ala Ser Val Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp

500

505

510

Gly Ser Phe Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Leu Ile Arg Ile Glu

515

520

525

Asn Leu Pro Val Lys Val Met Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met

530

535

540

Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr

545

550

555

560

Tyr Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val

565

570

575

Thr Ile Ala Lys Gly Phe Asn Ile Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys

580

585

590

Ser Glu Val Arg Ala Ala Ile Lys Lys Met Leu Glu Thr Pro Gly Pro

595

600

605

Tyr Leu Leu Asp Ile Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met

610

615

620

Ile Pro Ile Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly

625

630

635

640

Arg Thr Val Tyr

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 2294

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza sativa var. kinmaze

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (48)..(1979)

&lt;400&gt; 7

cccaaaccga gaaaccctcg ccgccgccgc cgccgccacc acccacc atg gct acg 56

Met Ala Thr

1

acc gcc gcg gcc gcg gcc gcc gcc ctg tcc gcc gcc gcg acg gcc aag 104

Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ser Ala Ala Ala Thr Ala Lys

5

10

15

acc ggc cgt aag aac cac cag cga cac cac gtc ctt ccc gct cga ggc 152

Thr Gly Arg Lys Asn His Gln Arg His His Val Leu Pro Ala Arg Gly

20

25

30

35

cgg gtg ggg gcg gcg gcg gtc agg tgc tcg gcg gtg tcc ccg gtc acc 200

Arg Val Gly Ala Ala Ala Val Arg Cys Ser Ala Val Ser Pro Val Thr

40

45

50

ccg ccg tcc ccg gcg ccg ccg gcc acg ccg ctc cgg ccg tgg ggg ccg 248



Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu Arg Pro Trp Gly Pro

55

60

65

gcc gag ccc cgc aag ggc gcg gac atc ctc gtg gag gcg ctg gag cgg 296

Ala Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala Leu Glu Arg

70

75

80

tgc ggc gtc agc gac gtg ttc gcc tac ccg ggc ggc gcg tcc atg gag 344

Cys Gly Val Ser Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu

85

90

95

atc cac cag gcg ctg acg cgc tcc ccg gtc atc acc aac cac ctc ttc 392

Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile Thr Asn His Leu Phe

100

105

110

115

cgc cac gag cag ggc gag gcg ttc gcg gcg tcc ggg tac gcg cgc gcg 440

Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr Ala Arg Ala

120

125

130

tcc ggc cgc gtc ggg gtc tgc gtc gcc acc tcc ggc ccc ggg gca acc 488

Ser Gly Arg Val Gly Val Cys Val Ala Thr Ser Gly Pro Gly Ala Thr

135

140

145

aac ctc gtg tcc gcg ctc gcc gac gcg ctg ctc gac tcc gtc ccg atg 536

Asn Leu Val Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser Val Pro Met

150

155

160

gtc gcc atc acg ggc cag gtc cac cgc cgc atg atc ggc acc gac gcc 584

Val Ala Ile Thr Gly Gln Val His Arg Arg Met Ile Gly Thr Asp Ala

165

170

175

ttc cag gag acg ccc ata gtc gag gtc acc cgc tcc atc acc aag cac 632

Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile Thr Lys His

180

185

190

195

aat tac ctt gtc ctt gat gtg gag gac atc ccc cgc gtc ata cag gaa 680

Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Val Ile Gln Glu

200

205

210

gcc ttc ttc ctc gcg tcc tcg ggc cgt cct ggc ccg gtg ctg gtc gac 728

Ala Phe Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val Leu Val Asp

215

220

225

atc ccc aag gac atc cag cag cag atg gcc gtg ccg gtc tgg gac acc 776

Ile Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val Pro Val Trp Asp Thr

230

235

240

tcg atg aat cta cca ggg tac atc gca cgc ctg ccc aag cca ccc gcg 824

Ser Met Asn Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys Pro Pro Ala

245

250

255

aca gaa ttg ctt gag cag gtc ttg cgt ctg gtt ggc gag tca cgg cgc 872

Thr Glu Leu Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu Ser Arg Arg

260

265

270

275

ccg att ctc tat gtc ggt ggt ggc tgc tct gca tct ggt gac gaa ttg 920

Pro Ile Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ser Ala Ser Gly Asp Glu Leu

280

285

290

cgc tgg ttt gtt gag ctg act ggt atc cca gtt aca acc act ctg atg	968
Arg Trp Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr Thr Leu Met	
295 300 305	
ggc ctc ggc aat ttc ccc agt gac gac ccg ttg tcc ctg cgc atg ctt	1016
Gly Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu Arg Met Leu	
310 315 320	
ggg atg cat ggc acg gtg tac gca aat tat gcc gtg gat aag gct gac	1064
Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp Lys Ala Asp	
325 330 335	
ctg ttg ctt gcg ttt ggt gtg cgg ttt gat gat cgt gtg aca ggg aaa	1112
Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val Thr Gly Lys	
340 345 350 355	
att gag gct ttt gca agc agg gcc aag att gtg cac att gac att gat	1160
Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile Asp Ile Asp	
360 365 370	
cca gca gag att gga aag aac aag caa cca cat gtg tca att tgc gca	1208
Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser Ile Cys Ala	
375 380 385	
gat gtt aag ctt gct tta cag ggc ttg aat gct ctg cta caa cag agc	1256
Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Leu Asn Ala Leu Leu Gln Gln Ser	
390 395 400	

aca aca aag aca agt tct gat ttt agt gca tgg cac aat gag ttg gac 1304

Thr Thr Lys Thr Ser Ser Asp Phe Ser Ala Trp His Asn Glu Leu Asp

405

410

415

cag cag aag agg gag ttt cct ctg ggg tac aaa act ttt ggt gaa gag 1352

Gln Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Phe Gly Glu Glu

420

425

430

435

atc cca ccg caa tat gcc att cag gtg ctg gat gag ctg acg aaa ggt 1400

Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu Thr Lys Gly

440

445

450

gag gca atc atc gct act ggt gtt ggg cag cac cag atg tgg gcg gca 1448

Glu Ala Ile Ile Ala Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met Trp Ala Ala

455

460

465

caa tat tac acc tac aag cgg cca cgg cag tgg ctg tct tcg gct ggt 1496

Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser Ser Ala Gly

470

475

480

ctg ggc gca atg gga ttt ggg ctg cct gct gca gct ggt gct tct gtg 1544

Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly Ala Ser Val

485

490

495

gct aac cca ggt gtc aca gtt gtt gat att gat ggg gat ggt agc ttc 1592

Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser Phe

500

505

510

515

ctc atg aac att cag gag ctg gca ttg atc cgc att gag aac ctc cct 1640

Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Leu Ile Arg Ile Glu Asn Leu Pro

520

525

530

gtg aag gtg atg gtg ttg aac aac caa cat ttg ggt atg gtg gtg caa 1688

Val Lys Val Met Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Val Gln

535

540

545

ttg gag gat agg ttt tac aag gcg aat agg gcg cat aca tac ttg ggc 1736

Leu Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu Gly

550

555

560

aac ccg gaa tgt gag agc gag ata tat cca gat ttt gtg act att gct 1784

Asn Pro Glu Cys Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val Thr Ile Ala

565

570

575

aag ggg ttc aat att cct gca gtc cgt gta aca aag aag agt gaa gtc 1832

Lys Gly Phe Asn Ile Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys Ser Glu Val

580

585

590

595

cgt gcc gcc atc aag aag atg ctc gag act cca ggg cca tac ttg ttg 1880

Arg Ala Ala Ile Lys Lys Met Leu Glu Thr Pro Gly Pro Tyr Leu Leu

600

605

610

gat atc atc gtc ccg cac cag gag cat gtg ctg cct atg atc cca att 1928

Asp Ile Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro Ile

615

620

625

ggg ggc gca ttc aag gac atg atc ctg gat ggt gat ggc agg act gtg 1976

Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly Arg Thr Val

630

635

640

tat taatctataa tctgtatggt ggcaaagcac cagcccggcc tatgtttgac 2029

Tyr

ctgaatgacc cataaagagt ggtatgccta tgatgtttgt atgtgctcta tcaataacta 2089

agggtgcaac tatgaaccat atgctcttct gttttacttg tttgatgtgc ttggcatggt 2149

aatcctaatt agcttcctgc tgtctagggt tgtagtgtgt tgttttctgt aggcatatgc 2209

atcacaagat atcatgtaag ttctttgtcc tacatatcaa taataagaga ataaagtact 2269

tctatgtaaa aaaaaaaaaa aaaaa 2294

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 644

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Oryza sativa var. kinmaze

&lt;400&gt; 8

Met Ala Thr Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ser Ala Ala Ala

1

5

10

15

Thr Ala Lys Thr Gly Arg Lys Asn His Gln Arg His His Val Leu Pro

20

25

30

Ala Arg Gly Arg Val Gly Ala Ala Ala Val Arg Cys Ser Ala Val Ser

35

40

45

Pro Val Thr Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu Arg Pro

50

55

60

Trp Gly Pro Ala Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala

65

70

75

80

Leu Glu Arg Cys Gly Val Ser Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala

85

90

95

Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile Thr Asn

100

105

110

His Leu Phe Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr

115

120

125

Ala Arg Ala Ser Gly Arg Val Gly Val Cys Val Ala Thr Ser Gly Pro

130

135

140

Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser

145

150

155

160

Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val His Arg Arg Met Ile Gly

165

170

175

Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile

180

185

190

Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Val

195

200

205

Ile Gln Glu Ala Phe Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val

210

215

220

Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val Pro Val

225

230

235

240

Trp Asp Thr Ser Met Asn Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys

245

250

255

Pro Pro Ala Thr Glu Leu Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu

260

265

270

Ser Arg Arg Pro Ile Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ser Ala Ser Gly

275

280

285

Asp Glu Leu Arg Trp Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr

290

295

300

Thr Leu Met Gly Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu

305

310

315

320

Arg Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp

325

330

335

Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val

340

345

350



Thr Gly Lys Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile  
355 360 365

Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser  
370 375 380

Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Leu Asn Ala Leu Leu  
385 390 395 400

Gln Gln Ser Thr Thr Lys Thr Ser Ser Asp Phe Ser Ala Trp His Asn  
405 410 415

Glu Leu Asp Gln Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Phe  
420 425 430

Gly Glu Glu Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu  
435 440 445

Thr Lys Gly Glu Ala Ile Ile Ala Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met  
450 455 460

Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser  
465 470 475 480

Ser Ala Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly  
485 490 495

Ala Ser Val Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp

500

505

510

Gly Ser Phe Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Leu Ile Arg Ile Glu

515

520

525

Asn Leu Pro Val Lys Val Met Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met

530

535

540

Val Val Gln Leu Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr

545

550

555

560

Tyr Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val

565

570

575

Thr Ile Ala Lys Gly Phe Asn Ile Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys

580

585

590

Ser Glu Val Arg Ala Ala Ile Lys Lys Met Leu Glu Thr Pro Gly Pro

595

600

605

Tyr Leu Leu Asp Ile Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met

610

615

620

Ile Pro Ile Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly

625

630

635

640

Arg Thr Val Tyr

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 9

gctctgctac aacagagcac a

21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 10

agtcctgcca tcaccatcca g

21

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 11

ctgggacacc tcgatgaat

19

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 12

caacaaacca gcgcaattcg tcacc

25

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 13

catcaccaac cacctctt

18

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 14

aactgggata ccagtcagct c

21

<210> 15

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 15

tgtgcttggt gatgga

16

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 16

tcaaggacat gacctggat gg

22

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 17

cagcgacgtg ttgccta

18

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 18

ccaccgacat agagaatc

18

<210> 19

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 19

acacggactg caggaata

18

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 20

ttacaaggcg aatagggc

18

<210> 21

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 21

gcacattctt gatggcg

17

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 22

atgcatggca cggtgtac

18

<210> 23

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 23

gattgcctca cctttcg

17

<210> 24

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 24

aggtgtcaca gttgttg

17

<210> 25

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 25

agaggtgggtt ggtgatg

17

<210> 26

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 26

gctttgccaa catacag

17

<210> 27

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 27

cagcccaaatt cccattg

17

<210> 28

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 28

atgtaccctg gtagattc

18

<210> 29

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<220>

<221> variation

<222> 15

<223> n represents a, c, g or t

<400> 29

gtttygctay ccggnngg

17

<210> 30

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 30

ggaaacagct atgaccatg

19

<210> 31

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 31

ccgggagctg catgtgtcag agg

23

<210> 32

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 32

gggctggcaa gccacgtttg gtg

23

<210> 33

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 33

ccccagccgc atgacggca ccgacgcctt

30

<210> 34

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 34

cggcgccgat catgcggctg gggacct

27

【 0 1 6 6 】

【配列表フリーテキスト】

配列番号 9 ～ 3 4 はプライマーである。

【 0 1 6 7 】

配列番号 2 9 における第 1 5 番目の n は a , c , g 又は t を表している。

【図面の簡単な説明】

【図 1 A】

変異型 ALS タンパク質のアミノ酸配列及び野生型 ALS タンパク質のアミノ酸配列を比較した図である。

【図 1 B】

図 1 A の続きであり、変異型 ALS タンパク質のアミノ酸配列及び野生型 ALS タンパク質のアミノ酸配列を比較した図である。

【図 2 A】

変異型 ALS 遺伝子の塩基配列及び野生型 ALS 遺伝子の塩基配列を比較した図である。

【図 2 B】

図 2 A の続きであり、変異型 ALS 遺伝子の塩基配列及び野生型 ALS 遺伝子の塩基配列を比較した図である。

【図 2 C】

図 2 B の続きであり、変異型 ALS 遺伝子の塩基配列及び野生型 ALS 遺伝子の塩基配列を比較した図である。

【図 2 D】

図 2 C の続きであり、変異型 ALS 遺伝子の塩基配列及び野生型 ALS 遺伝子の塩基配列を比較した図である。

【図 3】

Rb 系統の bispyribac-sodium に対する感受性を示す特性図である。

【図 4】

Sr 系統の bispyribac-sodium に対する感受性を示す特性図である。

【図 5】

Ga 系統の bispyribac-sodium に対する感受性を示す特性図である。

【図 6】

Vg 系統の bispyribac-sodium に対する感受性を示す特性図である。

【図 7】

野性株のbispyribac-sodiumに対する感受性を示す特性図である。

【図 8】

野性株のchlorsulfuronに対する感受性を示す特性図である。

【図 9】

Rb系統のchlorsulfuronに対する感受性を示す特性図である。

【図 1 0】

Sr系統のchlorsulfuronに対する感受性を示す特性図である。

【図 1 1】

Ga系統のchlorsulfuronに対する感受性を示す特性図である。

【図 1 2】

Vg系統のchlorsulfuronに対する感受性を示す特性図である。

【図 1 3】

抵抗性変異株のALSタンパク質の分離を目的とした陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにおけるフラクション番号とOD 525 nmの吸光度との関係を示す特性図である。

【図 1 4】

野生株のALSタンパク質の分離を目的とした陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにおけるフラクション番号とOD 525 nmの吸光度との関係を示す特性図である。

【図 1 5】

野生型ALSタンパク質及び変異型ALSタンパク質におけるbispyribac-sodiumに対する感受性を示す特性図である。

【図 1 6】

野生型ALSタンパク質及び変異型ALSタンパク質におけるchlorsulfuronに対する感受性を示す特性図である。

【図 1 7】

野生型ALSタンパク質及び変異型ALSタンパク質におけるimazaquinに対する感受性を示す特性図である。

【図18A】

日本晴ESTの塩基配列とトウモロコシALS遺伝子の塩基配列を比較した図である。

【図18B】

図18Aの続きであり、日本晴ESTの塩基配列とトウモロコシALS遺伝子の塩基配列を比較した図である。

【図19A】

Sr系統由来の完全長cDNAの塩基配列と野性型cDNA 1 の塩基配列を比較した図である。

【図19B】

図19Aの続きであり、Sr系統由来の完全長cDNAの塩基配列と野性型cDNA 1 の塩基配列を比較した図である。

【図19C】

図19Bの続きであり、Sr系統由来の完全長cDNAの塩基配列と野性型cDNA 1 の塩基配列を比較した図である。

【図20】

G1643T (W548L) 変異及びG1880T (S627I) 変異をそれぞれ単独で有するALS cDNAの合成とこれを保持するpGEX 2Tの作製方法を示した図である。矢印はプライマー、アスタリスクは変異点を表す。

【図21】

C512A (P171H) 変異DNA断片及びC514A (R172S) 変異DNA断片作製方法を示した図である。矢印はプライマー、アスタリスクは変異点を表す。

【図22】

C512A (P171H) 変異及びC514A (R172S) 変異をそれぞれ単独で有するALS cDNAの合成とこれを保持するpGEX 2Tの作製方法を示した図である。アスタリスクは変異点を表す。

【図23】

C512A(P171H)/C514A(R172S)を有するDNA断片の作製方法を示した図である。矢印はプライマー、アスタリスクは変異点を表す。



## 【図 2 4】

P171H/W548L変異型ALS cDNA及びP171H/S627I変異型ALS cDNAの合成とこれを保持するpGEX 2Tの作製方法を示した図である。アスタリスクは変異点を表す。

## 【図 2 5】

P171H/W548L/S627I変異型ALS cDNAの合成とこれを保持するpGEX 2Tの作製方法を示した図である。アスタリスクは変異点を表す。

## 【図 2 6】

1点変異型ALS遺伝子がコードする変異型ALSタンパク質のbispyribac-sodiumに対する感受性を野性型ALSタンパク質と比較した図である。

## 【図 2 7】

2点変異型及び3点変異型ALS遺伝子がコードする変異型ALSタンパク質のbispyribac-sodiumに対する感受性を野性型と比較した図である。

## 【書類名】 図面

## 【図 1 A】

Wild	1	MATTAATAAATAAKTGRKNHQHHLVLPARGRVGAAAVRCSAVSPVTPPSPAPPAT	60
P/R Mutant	1	MATTAATAAATAAKTGRKNHQHHLVLPARGRVGAAAVRCSAVSPVTPPSPAPPAT	60
P/W Mutant	1	MATTAATAAATAAKTGRKNHQHHLVLPARGRVGAAAVRCSAVSPVTPPSPAPPAT	60
P/S Mutant	1	MATTAATAAATAAKTGRKNHQHHLVLPARGRVGAAAVRCSAVSPVTPPSPAPPAT	60
P/S/W Mutant	1	MATTAATAAATAAKTGRKNHQHHLVLPARGRVGAAAVRCSAVSPVTPPSPAPPAT	60
*****			
Wild	61	PLRPWGPAEPRKGADILVEALERCVSDFAYPGGASMEIHQALTRSPVITNHLFRHEQG	120
P/R Mutant	61	PLRPWGPAEPRKGADILVEALERCVSDFAYPGGASMEIHQALTRSPVITNHLFRHEQG	120
P/W Mutant	61	PLRPWGPAEPRKGADILVEALERCVSDFAYPGGASMEIHQALTRSPVITNHLFRHEQG	120
P/S Mutant	61	PLRPWGPAEPRKGADILVEALERCVSDFAYPGGASMEIHQALTRSPVITNHLFRHEQG	120
P/S/W Mutant	61	PLRPWGPAEPRKGADILVEALERCVSDFAYPGGASMEIHQALTRSPVITNHLFRHEQG	120
*****			
Wild	121	EAFASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLVSALADALLDSVPMVAITGQVPRRMIGTDAF	180
P/R Mutant	121	EAFASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLVSALADALLDSVPMVAITGQVPRRMIGTDAF	180
P/W Mutant	121	EAFASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLVSALADALLDSVPMVAITGQVPRRMIGTDAF	180
P/S Mutant	121	EAFASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLVSALADALLDSVPMVAITGQVPRRMIGTDAF	180
P/S/W Mutant	121	EAFASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLVSALADALLDSVPMVAITGQVPRRMIGTDAF	180
*****			
Wild	181	QETPIVEVTRTSITKHNYLVLDVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQMAVPV	240
P/R Mutant	181	QETPIVEVTRTSITKHNYLVLDVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQMAVPV	240
P/W Mutant	181	QETPIVEVTRTSITKHNYLVLDVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQMAVPV	240
P/S Mutant	181	QETPIVEVTRTSITKHNYLVLDVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQMAVPV	240
P/S/W Mutant	181	QETPIVEVTRTSITKHNYLVLDVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQMAVPV	240
*****			
Wild	241	WDTSMNLPGYIARLPKPPATELLEQVLRVLVGESRRPILYVGGGCSASGDELRFVVELTGI	300
P/R Mutant	241	WDTSMNLPGYIARLPKPPATELLEQVLRVLVGESRRPILYVGGGCSASGDELRFVVELTGI	300
P/W Mutant	241	WDTSMNLPGYIARLPKPPATELLEQVLRVLVGESRRPILYVGGGCSASGDELRFVVELTGI	300
P/S Mutant	241	WDTSMNLPGYIARLPKPPATELLEQVLRVLVGESRRPILYVGGGCSASGDELRFVVELTGI	300
P/S/W Mutant	241	WDTSMNLPGYIARLPKPPATELLEQVLRVLVGESRRPILYVGGGCSASGDELRFVVELTGI	300
*****			
Wild	301	PVTTTLMGLGNFSPDDPLSLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLAFGVRFDDRTVGKIEAFA	360
P/R Mutant	301	PVTTTLMGLGNFSPDDPLSLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLAFGVRFDDRTVGKIEAFA	360
P/W Mutant	301	PVTTTLMGLGNFSPDDPLSLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLAFGVRFDDRTVGKIEAFA	360
P/S Mutant	301	PVTTTLMGLGNFSPDDPLSLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLAFGVRFDDRTVGKIEAFA	360
P/S/W Mutant	301	PVTTTLMGLGNFSPDDPLSLRMLGMHGTVYANYAVDKADLLAFGVRFDDRTVGKIEAFA	360
*****			
Wild	361	SRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSIKADVKLALQGLNALLQSTTKTSSDFSAAWHNELDQ	420
P/R Mutant	361	SRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSIKADVKLALQGLNALLQSTTKTSSDFSAAWHNELDQ	420
P/W Mutant	361	SRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSIKADVKLALQGLNALLQSTTKTSSDFSAAWHNELDQ	420
P/S Mutant	361	SRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSIKADVKLALQGLNALLQSTTKTSSDFSAAWHNELDQ	420
P/S/W Mutant	361	SRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSIKADVKLALQGLNALLQSTTKTSSDFSAAWHNELDQ	420
*****			
Wild	421	QKREFPLGYKTFGEEIPPQYAIQVLDLTKGEAIATGVGQHQMWAQYTYKRPQWLS	480
P/R Mutant	421	QKREFPLGYKTFGEEIPPQYAIQVLDLTKGEAIATGVGQHQMWAQYTYKRPQWLS	480
P/W Mutant	421	QKREFPLGYKTFGEEIPPQYAIQVLDLTKGEAIATGVGQHQMWAQYTYKRPQWLS	480
P/S Mutant	421	QKREFPLGYKTFGEEIPPQYAIQVLDLTKGEAIATGVGQHQMWAQYTYKRPQWLS	480
P/S/W Mutant	421	QKREFPLGYKTFGEEIPPQYAIQVLDLTKGEAIATGVGQHQMWAQYTYKRPQWLS	480
*****			
Wild	481	SAGLGAMGFLPAAAGASVANPGTVVDIDGDGSLMNIQELALIRIENLPVKVMVLNNQ	540
P/R Mutant	481	SAGLGAMGFLPAAAGASVANPGTVVDIDGDGSLMNIQELALIRIENLPVKVMVLNNQ	540
P/W Mutant	481	SAGLGAMGFLPAAAGASVANPGTVVDIDGDGSLMNIQELALIRIENLPVKVMVLNNQ	540

## 【図 1 B】

P/S Mutant	481	SAGLGAMGFGLPAAAGASVANPGVTVDIDGGSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLNNQ	540
P/S/W Mutant	481	SAGLGAMGFGLPAAAGASVANPGVTVDIDGGSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLNNQ	540
		*****	
Wild	541	HLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPCESEIYPDFVTIAKGFNIPAVRVTKKSEVRAAIK	600
P/R Mutant	541	HLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPCESEIYPDFVTIAKGFNIPAVRVTKKSEVRAAIK	600
P/W Mutant	541	HLGMVVQLED RFYKANRAHTYLGNPCESEIYPDFVTIAKGFNIPAVRVTKKSEVRAAIK	600
P/S Mutant	541	HLGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPCESEIYPDFVTIAKGFNIPAVRVTKKSEVRAAIK	600
P/S/W Mutant	541	HLGMVVQLED RFYKANRAHTYLGNPCESEIYPDFVTIAKGFNIPAVRVTKKSEVRAAIK	600
		*****	
Wild	601	KMLETPGPYLLDIIVPHQEHVLPMPISGGAFKDMILDGDGRTVY	644
P/R Mutant	601	KMLETPGPYLLDIIVPHQEHVLPMPISGGAFKDMILDGDGRTVY	644
P/W Mutant	601	KMLETPGPYLLDIIVPHQEHVLPMPISGGAFKDMILDGDGRTVY	644
P/S Mutant	601	KMLETPGPYLLDIIVPHQEHVLPMPISGGAFKDMILDGDGRTVY	644
P/S/W Mutant	601	KMLETPGPYLLDIIVPHQEHVLPMPISGGAFKDMILDGDGRTVY	644
		*****	

【図 2 A】

Wild	1	CCCAAACCCAGAAACCTCGCCGCGCGCGCCGCCACCCACCATGGC	60
P/R Mutation	1	CCCAAACCCAGAAACCTCGCCGCGCGCGCGCCGCCACCCACCATGGC	60
P/W Mutation	1	CCCAAACCCAGAAACCTCGCCGCGCGCGCGCCGCCACCCACCATGGC	60
P/S Mutation	1	CCCAAACCCAGAAACCTCGCCGCGCGCGCGCCGCCACCCACCATGGC	60
P/W/S Mutation	1	CCCAAACCCAGAAACCTCGCCGCGCGCGCGCCGCCACCCACCATGGC	60
*****			
Wild	61	CCGCGGCGCGCGCGCGCGCTGTCCGCGCGCGCGACGGCCAAGACCGGCCGT	120
P/R Mutation	61	CCGCGGCGCGCGCGCGCGCTGTCCGCGCGCGCGACGGCCAAGACCGGCCGT	120
P/W Mutation	61	CCGCGGCGCGCGCGCGCGCTGTCCGCGCGCGCGACGGCCAAGACCGGCCGT	120
P/S Mutation	61	CCGCGGCGCGCGCGCGCGCTGTCCGCGCGCGCGACGGCCAAGACCGGCCGT	120
P/W/S Mutation	61	CCGCGGCGCGCGCGCGCGCTGTCCGCGCGCGCGACGGCCAAGACCGGCCGT	120
*****			
Wild	121	ACCAGCGACACCACTGCTCTTCCCGCTCAGGCGCGGTGGGGCGCGCGGT	180
P/R Mutation	121	ACCAGCGACACCACTGCTCTTCCCGCTCAGGCGCGGTGGGGCGCGCGGT	180
P/W Mutation	121	ACCAGCGACACCACTGCTCTTCCCGCTCAGGCGCGGTGGGGCGCGCGGT	180
P/S Mutation	121	ACCAGCGACACCACTGCTCTTCCCGCTCAGGCGCGGTGGGGCGCGCGGT	180
P/W/S Mutation	121	ACCAGCGACACCACTGCTCTTCCCGCTCAGGCGCGGTGGGGCGCGCGGT	180
*****			
Wild	181	CGGCGGTGTCCCGGTACCCCGCGTCCCGGCGCGCGGCCACGGCGTCCGGCGT	240
P/R Mutation	181	CGGCGGTGTCCCGGTACCCCGCGTCCCGGCGCGCGGCCACGGCGTCCGGCGT	240
P/W Mutation	181	CGGCGGTGTCCCGGTACCCCGCGTCCCGGCGCGCGGCCACGGCGTCCGGCGT	240
P/S Mutation	181	CGGCGGTGTCCCGGTACCCCGCGTCCCGGCGCGCGGCCACGGCGTCCGGCGT	240
P/W/S Mutation	181	CGGCGGTGTCCCGGTACCCCGCGTCCCGGCGCGCGGCCACGGCGTCCGGCGT	240
*****			
Wild	241	GGGGGCGGCGCGAGCCCCCAAGGGCGCGGACATCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGTGCG	300
P/R Mutation	241	GGGGGCGGCGCGAGCCCCCAAGGGCGCGGACATCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGTGCG	300
P/W Mutation	241	GGGGGCGGCGCGAGCCCCCAAGGGCGCGGACATCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGTGCG	300
P/S Mutation	241	GGGGGCGGCGCGAGCCCCCAAGGGCGCGGACATCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGTGCG	300
P/W/S Mutation	241	GGGGGCGGCGCGAGCCCCCAAGGGCGCGGACATCTCGTGGAGGCGCTGGAGCGGTGCG	300
*****			
Wild	301	CGCTCAGCGACGTGTTCCGCTACCCGGGCGCGCGTCCATGGAGATCCACAGGCGCTGA	360
P/R Mutation	301	CGCTCAGCGACGTGTTCCGCTACCCGGGCGCGCGTCCATGGAGATCCACAGGCGCTGA	360
P/W Mutation	301	CGCTCAGCGACGTGTTCCGCTACCCGGGCGCGCGTCCATGGAGATCCACAGGCGCTGA	360
P/S Mutation	301	CGCTCAGCGACGTGTTCCGCTACCCGGGCGCGCGTCCATGGAGATCCACAGGCGCTGA	360
P/W/S Mutation	301	CGCTCAGCGACGTGTTCCGCTACCCGGGCGCGCGTCCATGGAGATCCACAGGCGCTGA	360
*****			
Wild	361	CGCGCTCCCGGTATCACCACCACTCTTCCGCCACGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGG	420
P/R Mutation	361	CGCGCTCCCGGTATCACCACCACTCTTCCGCCACGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGG	420
P/W Mutation	361	CGCGCTCCCGGTATCACCACCACTCTTCCGCCACGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGG	420
P/S Mutation	361	CGCGCTCCCGGTATCACCACCACTCTTCCGCCACGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGG	420
P/W/S Mutation	361	CGCGCTCCCGGTATCACCACCACTCTTCCGCCACGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGG	420
*****			
Wild	421	CGTCCGGGTACGCGCGCGGTCCGGCGCGTCCGGGTCTGCTCGCCACCTCCGGCCCCG	480
P/R Mutation	421	CGTCCGGGTACGCGCGCGGTCCGGCGCGTCCGGGTCTGCTCGCCACCTCCGGCCCCG	480
P/W Mutation	421	CGTCCGGGTACGCGCGCGGTCCGGCGCGTCCGGGTCTGCTCGCCACCTCCGGCCCCG	480
P/S Mutation	421	CGTCCGGGTACGCGCGCGGTCCGGCGCGTCCGGGTCTGCTCGCCACCTCCGGCCCCG	480
P/W/S Mutation	421	CGTCCGGGTACGCGCGCGGTCCGGCGCGTCCGGGTCTGCTCGCCACCTCCGGCCCCG	480
*****			
Wild	481	GGGCAACCAACCTCGTGTCCGCGCTCGCCGACGCGTGTCTGACTCCGTCCCGATGGTCCG	540
P/R Mutation	481	GGGCAACCAACCTCGTGTCCGCGCTCGCCGACGCGTGTCTGACTCCGTCCCGATGGTCCG	540
P/W Mutation	481	GGGCAACCAACCTCGTGTCCGCGCTCGCCGACGCGTGTCTGACTCCGTCCCGATGGTCCG	540
P/S Mutation	481	GGGCAACCAACCTCGTGTCCGCGCTCGCCGACGCGTGTCTGACTCCGTCCCGATGGTCCG	540
P/W/S Mutation	481	GGGCAACCAACCTCGTGTCCGCGCTCGCCGACGCGTGTCTGACTCCGTCCCGATGGTCCG	540
*****			
Wild	541	CCATCAGGGGCCAGGTCCCCCGCGCATGATCGGCACGACGCTTCCAGGAGACGCCCA	600
P/R Mutation	541	CCATCAGGGGCCAGGTCCCCCGCGCATGATCGGCACGACGCTTCCAGGAGACGCCCA	600
P/W Mutation	541	CCATCAGGGGCCAGGTCCCCCGCGCATGATCGGCACGACGCTTCCAGGAGACGCCCA	600
P/S Mutation	541	CCATCAGGGGCCAGGTCCCCCGCGCATGATCGGCACGACGCTTCCAGGAGACGCCCA	600
P/W/S Mutation	541	CCATCAGGGGCCAGGTCCCCCGCGCATGATCGGCACGACGCTTCCAGGAGACGCCCA	600
*****			
Wild	601	TAGTCGAGGTACCCCGCTCCATACCAAGCACAATTACCTTGTCTTGATGTGGAGGACA	660
P/R Mutation	601	TAGTCGAGGTACCCCGCTCCATACCAAGCACAATTACCTTGTCTTGATGTGGAGGACA	660
P/W Mutation	601	TAGTCGAGGTACCCCGCTCCATACCAAGCACAATTACCTTGTCTTGATGTGGAGGACA	660

## 【図 2 B】

P/S Mutation	601	TAGTTCGAGGTACCCGCTCCATACCAAGCACAAATACCTTGCTTGATGTGGAGGACA	660
P/W/S Mutation	601	*****	660
Wild	661	TCCCCCGGTATACAGGAAGCCTTCTCTCGCGTCCTCGGGCCGTCTGGCCCGGTGC	720
P/R Mutation	661	TCCCCCGGTATACAGGAAGCCTTCTCTCGCGTCCTCGGGCCGTCTGGCCCGGTGC	720
P/W Mutation	661	TCCCCCGGTATACAGGAAGCCTTCTCTCGCGTCCTCGGGCCGTCTGGCCCGGTGC	720
P/S Mutation	661	TCCCCCGGTATACAGGAAGCCTTCTCTCGCGTCCTCGGGCCGTCTGGCCCGGTGC	720
P/W/S Mutation	661	*****	720
Wild	721	TGTCGCATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCCGTGCCGGTCTGGACACCTCGA	780
P/R Mutation	721	TGTCGCATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCCGTGCCGGTCTGGACACCTCGA	780
P/W Mutation	721	TGTCGCATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCCGTGCCGGTCTGGACACCTCGA	780
P/S Mutation	721	TGTCGCATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCCGTGCCGGTCTGGACACCTCGA	780
P/W/S Mutation	721	*****	780
Wild	781	TGAATCTACAGGGTACATCGCAGCCTGCCAAGCCACCCGCGACAGAATTGCTTGAGC	840
P/R Mutation	781	TGAATCTACAGGGTACATCGCAGCCTGCCAAGCCACCCGCGACAGAATTGCTTGAGC	840
P/W Mutation	781	TGAATCTACAGGGTACATCGCAGCCTGCCAAGCCACCCGCGACAGAATTGCTTGAGC	840
P/S Mutation	781	TGAATCTACAGGGTACATCGCAGCCTGCCAAGCCACCCGCGACAGAATTGCTTGAGC	840
P/W/S Mutation	781	*****	840
Wild	841	AGGCTTGGCTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCGATTCTC"ATGTCGGTGGTGGCTGCT	900
P/R Mutation	841	AGGCTTGGCTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCGATTCTC"ATGTCGGTGGTGGCTGCT	900
P/W Mutation	841	AGGCTTGGCTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCGATTCTC"ATGTCGGTGGTGGCTGCT	900
P/S Mutation	841	AGGCTTGGCTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCGATTCTC"ATGTCGGTGGTGGCTGCT	900
P/W/S Mutation	841	*****	900
Wild	901	CTGCATCTGGTGACGAATTGCGCTGGTTGTTGAGCTGACTGGTATCCAGTTACAACCA	960
P/R Mutation	901	CTGCATCTGGTGACGAATTGCGCTGGTTGTTGAGCTGACTGGTATCCAGTTACAACCA	960
P/W Mutation	901	CTGCATCTGGTGACGAATTGCGCTGGTTGTTGAGCTGACTGGTATCCAGTTACAACCA	960
P/S Mutation	901	CTGCATCTGGTGACGAATTGCGCTGGTTGTTGAGCTGACTGGTATCCAGTTACAACCA	960
P/W/S Mutation	901	*****	960
Wild	961	CTCTGATGGGCTCGGCAATTTCCCAAGTGACGACCCGTTGTCCC"GCCATGCTTGGA	1020
P/R Mutation	961	CTCTGATGGGCTCGGCAATTTCCCAAGTGACGACCCGTTGTCCC"GCCATGCTTGGA	1020
P/W Mutation	961	CTCTGATGGGCTCGGCAATTTCCCAAGTGACGACCCGTTGTCCC"GCCATGCTTGGA	1020
P/S Mutation	961	CTCTGATGGGCTCGGCAATTTCCCAAGTGACGACCCGTTGTCCC"GCCATGCTTGGA	1020
P/W/S Mutation	961	*****	1020
Wild	1021	TGCATGGCAGGTGTACGCAAAATTATGCCGTGGATAAGGCTGACCTGTTGCTTGCGTTTG	1080
P/R Mutation	1021	TGCATGGCAGGTGTACGCAAAATTATGCCGTGGATAAGGCTGACCTGTTGCTTGCGTTTG	1080
P/W Mutation	1021	TGCATGGCAGGTGTACGCAAAATTATGCCGTGGATAAGGCTGACCTGTTGCTTGCGTTTG	1080
P/S Mutation	1021	TGCATGGCAGGTGTACGCAAAATTATGCCGTGGATAAGGCTGACCTGTTGCTTGCGTTTG	1080
P/W/S Mutation	1021	*****	1080
Wild	1081	GTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGACAGGGAAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCCAAGA	1140
P/R Mutation	1081	GTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGACAGGGAAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCCAAGA	1140
P/W Mutation	1081	GTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGACAGGGAAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCCAAGA	1140
P/S Mutation	1081	GTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGACAGGGAAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCCAAGA	1140
P/W/S Mutation	1081	*****	1140
Wild	1141	TTGTGCACATTGACATTGATCCAGCAGAGATTGGAAGAAACAAGCAACCACATGTGTCAA	1200
P/R Mutation	1141	TTGTGCACATTGACATTGATCCAGCAGAGATTGGAAGAAACAAGCAACCACATGTGTCAA	1200
P/W Mutation	1141	TTGTGCACATTGACATTGATCCAGCAGAGATTGGAAGAAACAAGCAACCACATGTGTCAA	1200
P/S Mutation	1141	TTGTGCACATTGACATTGATCCAGCAGAGATTGGAAGAAACAAGCAACCACATGTGTCAA	1200
P/W/S Mutation	1141	*****	1200
Wild	1201	TTTGGCGAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTACAACAGAGCACAA	1260
P/R Mutation	1201	TTTGGCGAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTACAACAGAGCACAA	1260
P/W Mutation	1201	TTTGGCGAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTACAACAGAGCACAA	1260
P/S Mutation	1201	TTTGGCGAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTACAACAGAGCACAA	1260
P/W/S Mutation	1201	*****	1260
Wild	1261	CAAGACAAAGTTCTGATTTTAGTGATGGCACAATGAGTTGACCCAGCAGAAGAGGGAGT	1320
P/R Mutation	1261	CAAGACAAAGTTCTGATTTTAGTGATGGCACAATGAGTTGACCCAGCAGAAGAGGGAGT	1320

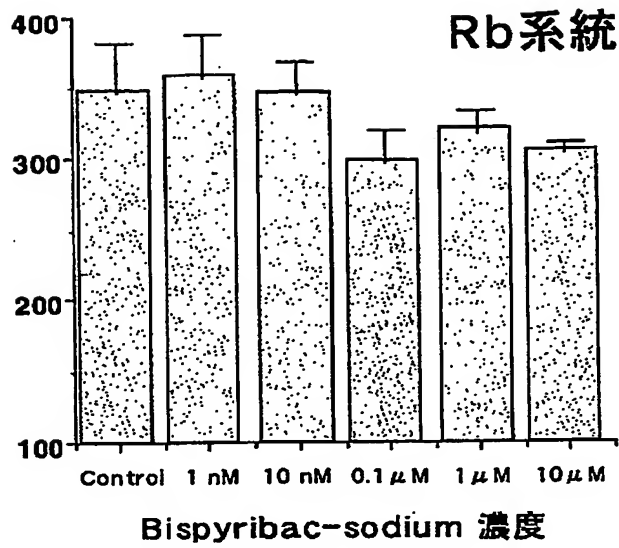


## 【図 2 D】

P/R Mutation	1921	TCCCAAGTGGGGGCGCATTCAAGGACATGATCCTGGATGGTGATGGCAGGACTGTGTATT	1980
P/W Mutation	1921	TCCCAAGTGGGGGCGCATTCAAGGACATGATCCTGGATGGTGATGGCAGGACTGTGTATT	1980
P/S Mutation	1921	TCCCAATTGGGGGCGCATTCAAGGACATGATCCTGGATGGTGATGGCAGGACTGTGTATT	1980
P/W/S Mutation	1921	TCCCAATTGGGGGCGCATTCAAGGACATGATCCTGGATGGTGATGGCAGGACTGTGTATT	1980
*****			
Wild	1981	AATCTATAATCTGTATGTTGGCAAAGCACCAGCCCGCCTATGTTTGACCTGAATGACCC	2040
P/R Mutation	1981	AATCTATAATCTGTATGTTGGCAAAGCACCAGCCCGCCTATGTTTGACCTGAATGACCC	2040
P/W Mutation	1981	AATCTATAATCTGTATGTTGGCAAAGCACCAGCCCGCCTATGTTTGACCTGAATGACCC	2040
P/S Mutation	1981	AATCTATAATCTGTATGTTGGCAAAGCACCAGCCCGCCTATGTTTGACCTGAATGACCC	2040
P/W/S Mutation	1981	AATCTATAATCTGTATGTTGGCAAAGCACCAGCCCGCCTATGTTTGACCTGAATGACCC	2040
*****			
Wild	2041	ATAAAGAGTGGTATGCCTATGATGTTTGTATGTGCTCTATCAATAACTAAGGTGTCAACT	2100
P/R Mutation	2041	ATAAAGAGTGGTATGCCTATGATGTTTGTATGTGCTCTATCAATAACTAAGGTGTCAACT	2100
P/W Mutation	2041	ATAAAGAGTGGTATGCCTATGATGTTTGTATGTGCTCTATCAATAACTAAGGTGTCAACT	2100
P/S Mutation	2041	ATAAAGAGTGGTATGCCTATGATGTTTGTATGTGCTCTATCAATAACTAAGGTGTCAACT	2100
P/W/S Mutation	2041	ATAAAGAGTGGTATGCCTATGATGTTTGTATGTGCTCTATCAATAACTAAGGTGTCAACT	2100
*****			
Wild	2101	ATGAACCATATGCTCTTCTGTTTACTTGTGTATGTGCTTGGCATGGTAATCCTAATTA	2160
P/R Mutation	2101	ATGAACCATATGCTCTTCTGTTTACTTGTGTATGTGCTTGGCATGGTAATCCTAATTA	2160
P/W Mutation	2101	ATGAACCATATGCTCTTCTGTTTACTTGTGTATGTGCTTGGCATGGTAATCCTAATTA	2160
P/S Mutation	2101	ATGAACCATATGCTCTTCTGTTTACTTGTGTATGTGCTTGGCATGGTAATCCTAATTA	2160
P/W/S Mutation	2101	ATGAACCATATGCTCTTCTGTTTACTTGTGTATGTGCTTGGCATGGTAATCCTAATTA	2160
*****			
Wild	2161	GCTTCCTGCTGTCTAGGTTTGTAGTGTGTTTCTGTAGGCATATGCATCACAAGATA	2220
P/R Mutation	2161	GCTTCCTGCTGTCTAGGTTTGTAGTGTGTTTCTGTAGGCATATGCATCACAAGATA	2220
P/W Mutation	2161	GCTTCCTGCTGTCTAGGTTTGTAGTGTGTTTCTGTAGGCATATGCATCACAAGATA	2220
P/S Mutation	2161	GCTTCCTGCTGTCTAGGTTTGTAGTGTGTTTCTGTAGGCATATGCATCACAAGATA	2220
P/W/S Mutation	2161	GCTTCCTGCTGTCTAGGTTTGTAGTGTGTTTCTGTAGGCATATGCATCACAAGATA	2220
*****			
Wild	2221	TCATGTAAGTTTCTTGTCTACATATCAATAATAAGAGAATAAAGTACTTCTATGCAAAA	2280
P/R Mutation	2221	TCATGTAAGTTTCTTGTCTACATATCAATAATAAGAGAATAAAGTACTTCTATGCAAAA	2280
P/W Mutation	2221	TCATGTAAGTTTCTTGTCTACATATCAATAATAAGAGAATAAAGTACTTCTATGCAAAA	2280
P/S Mutation	2221	TCATGTAAGTTTCTTGTCTACATATCAATAATAAGAGAATAAAGTACTTCTATGTA AAA	2280
P/W/S Mutation	2221	TCATGTAAGTTTCTTGTCTACATATCAATAATAAGAGAATAAAGTACTTCTATGTA AAA	2280
*****			
Wild	2281	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	2301
P/R Mutation	2281	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	2301
P/W Mutation	2281	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	2300
P/S Mutation	2281	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	2294
P/W/S Mutation	2281	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	2294
*****			

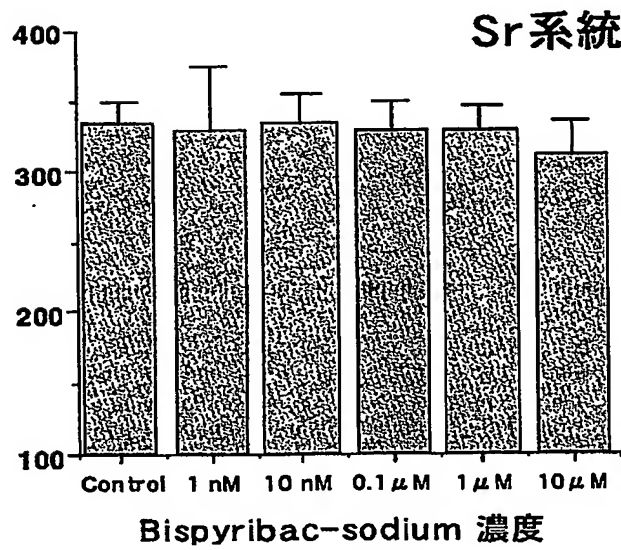
【図3】

8日目の相対重量%



【図4】

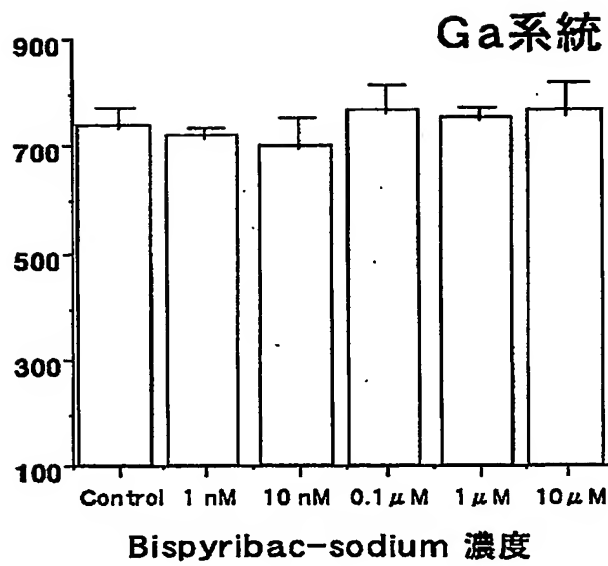
8日目の相対重量%





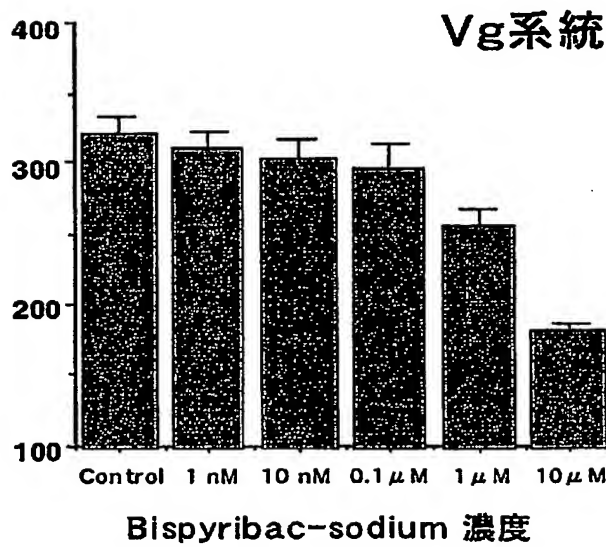
【図 5】

12日目の相対重量 %



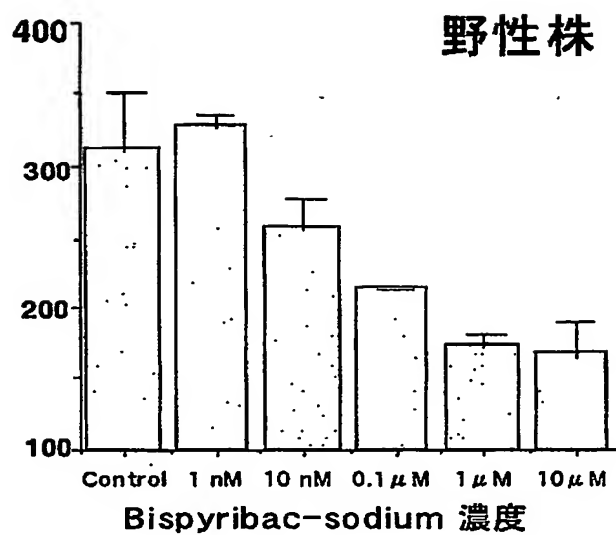
【図 6】

8日目の相対重量 %



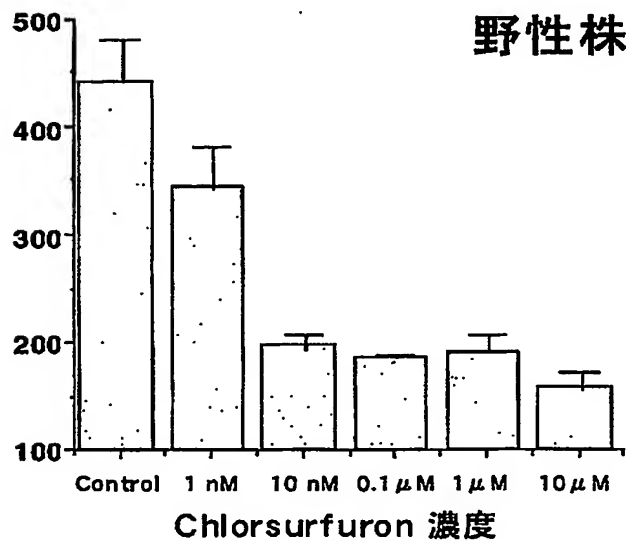
【図 7】

8日目の相対重量%



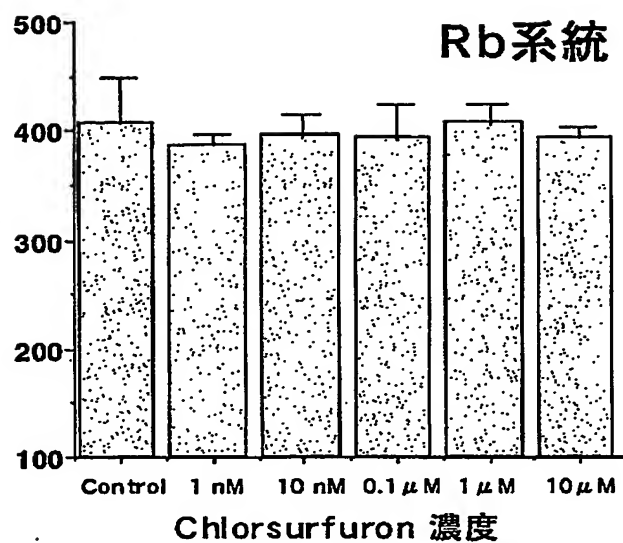
【図 8】

9日目の相対重量%



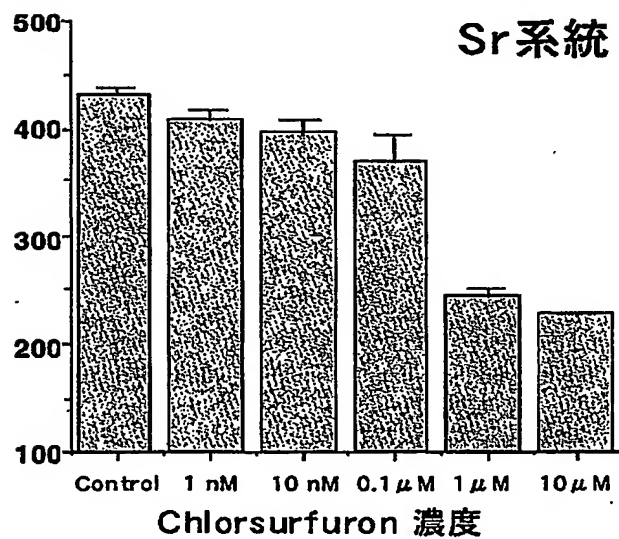
【図 9】

8日目の相対重量 %

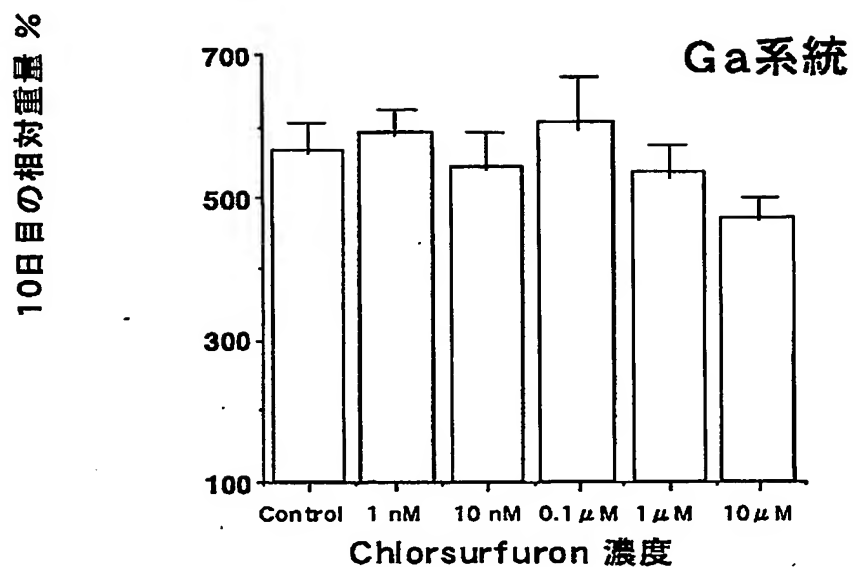


【図 1 0】

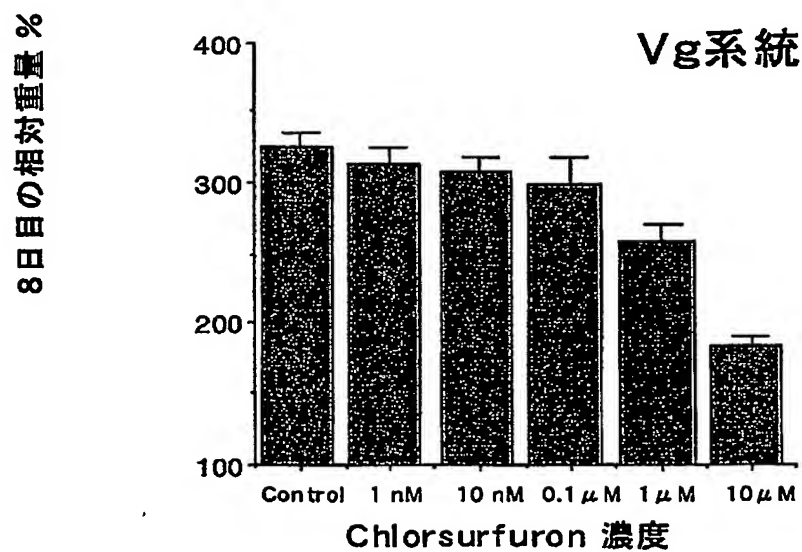
8日目の相対重量 %



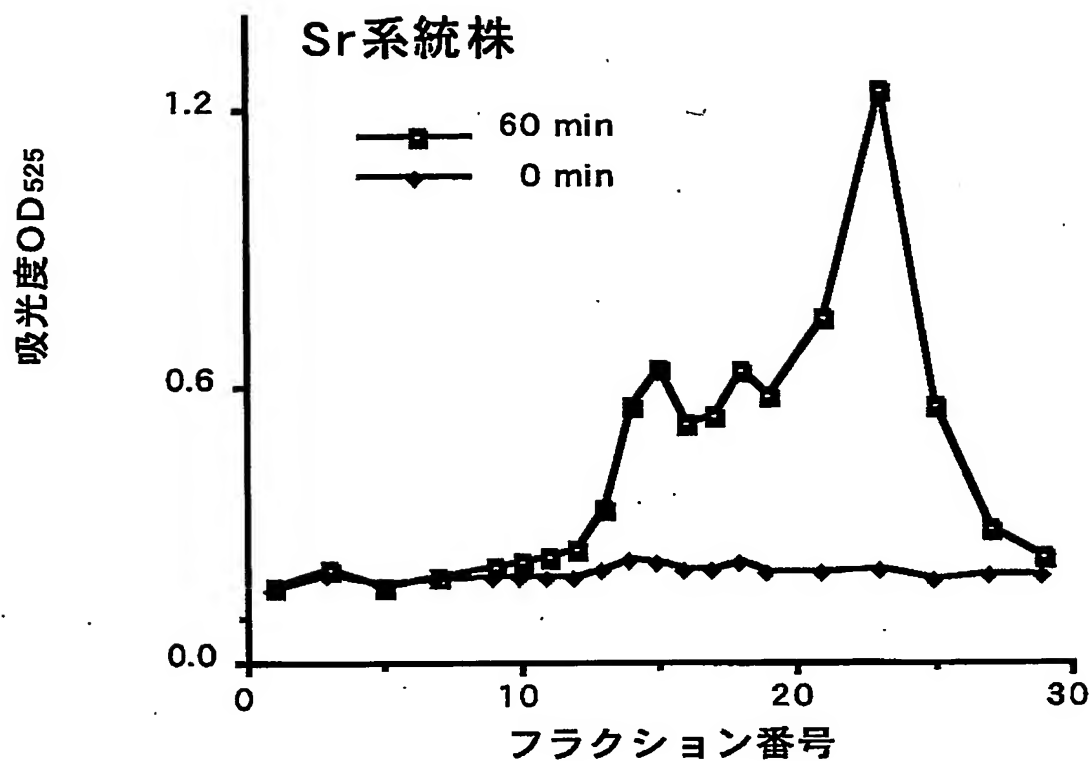
【図 1 1】



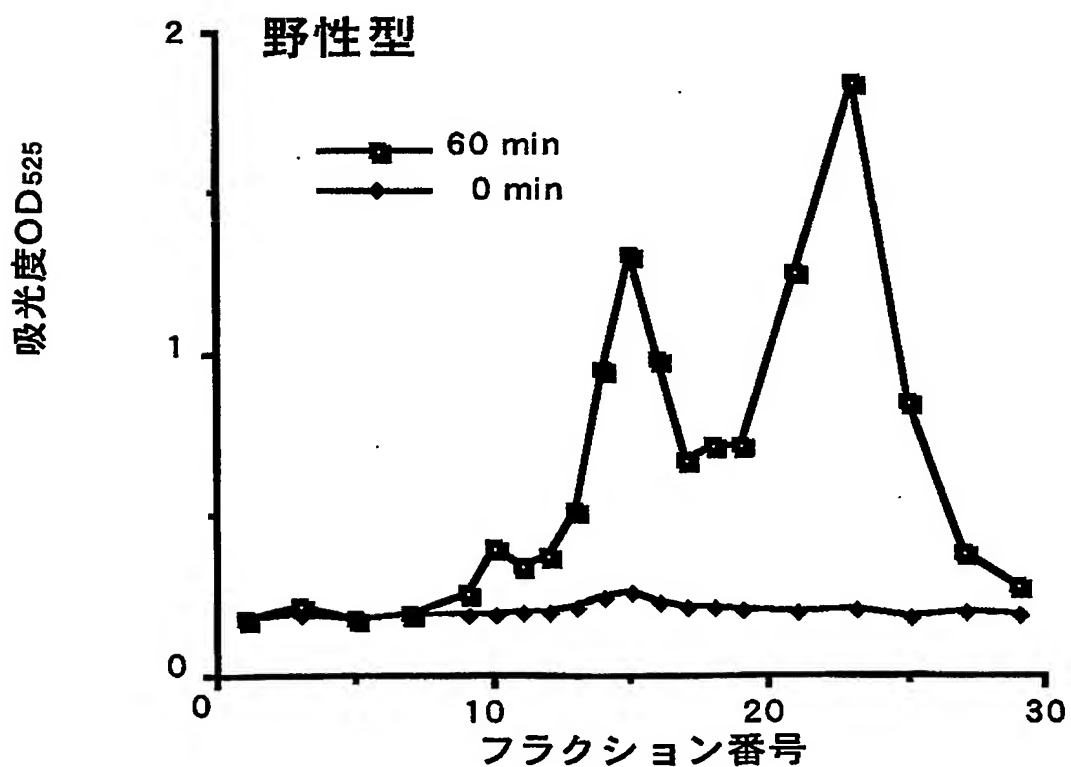
【図 1 2】



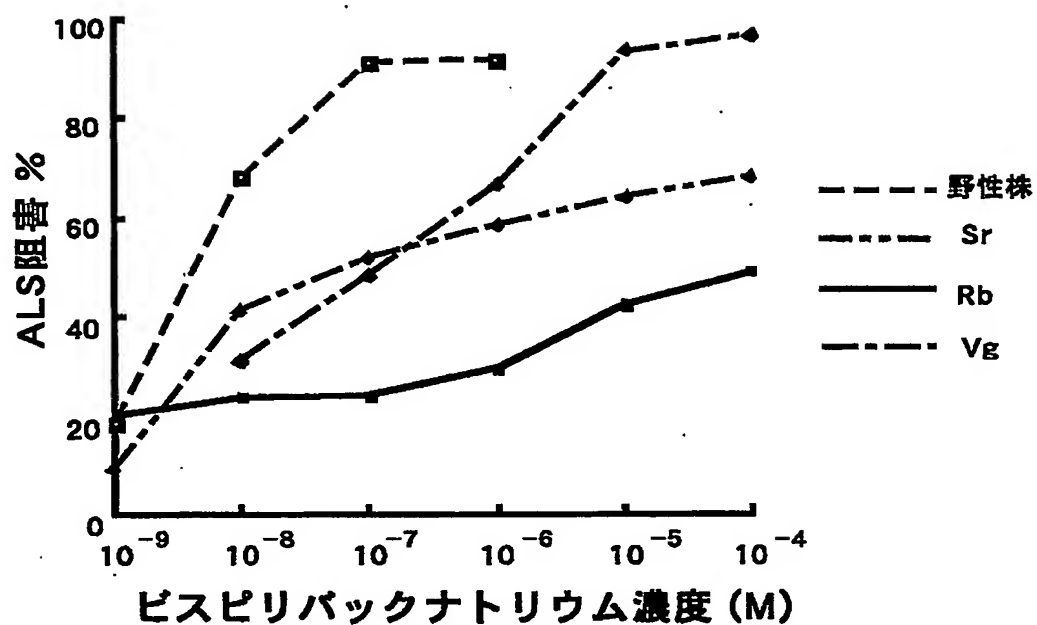
【図 13】



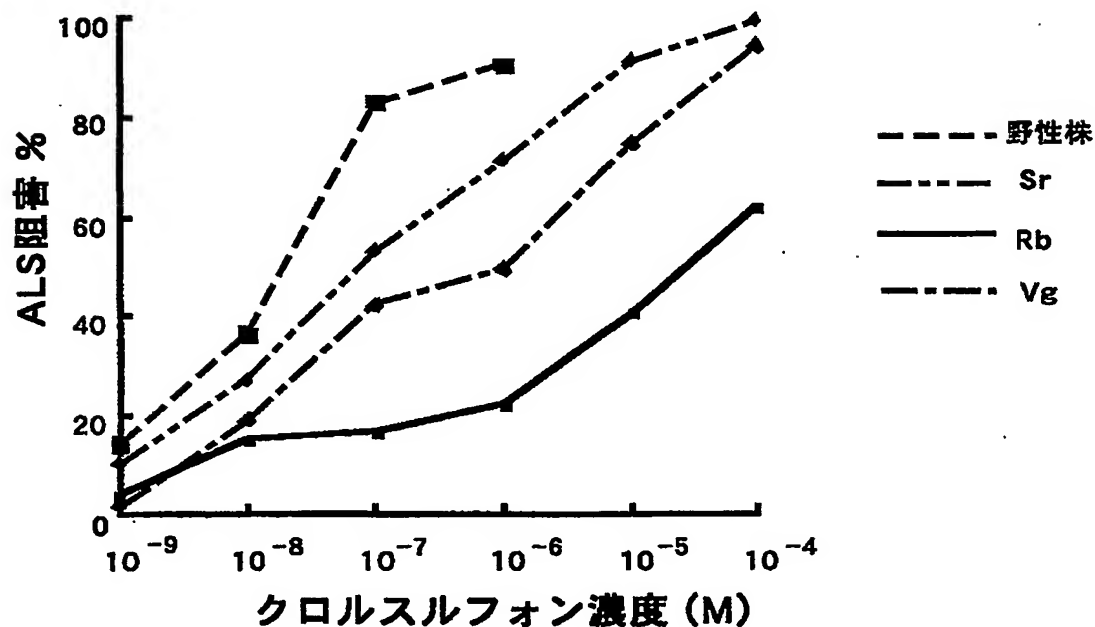
【図 14】



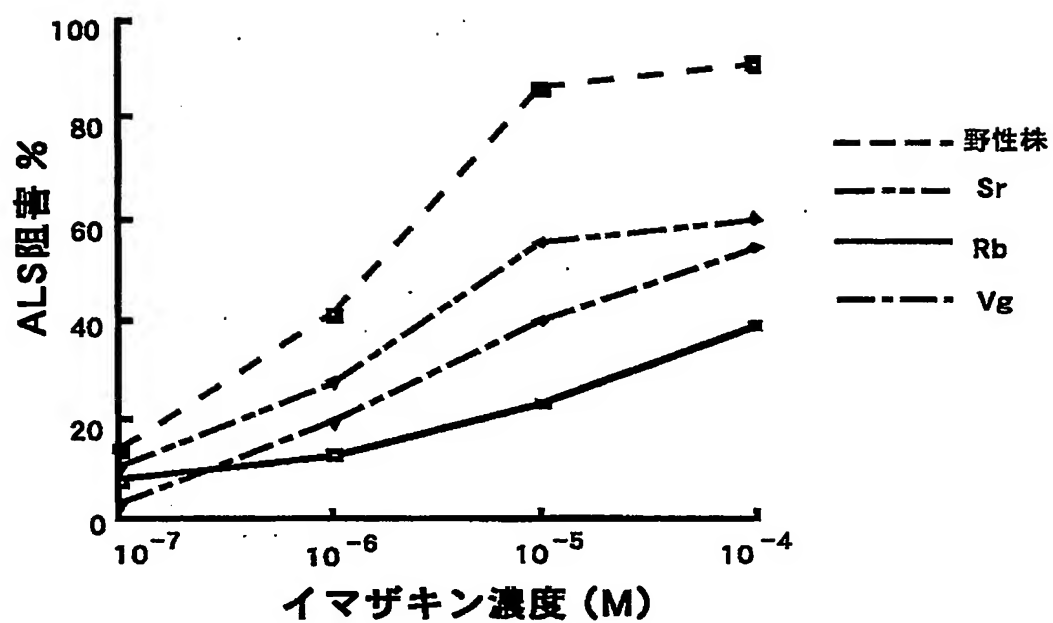
【図15】



【図16】



【図 17】



## 【図 1 8 A】

## 1st Nucleotide Sequence

File Name : Nipponbare ALS partial cDNA  
Sequence Size : 1505

## 2nd Nucleotide Sequence

File Name : X63554 nsize ALS 1  
Sequence Size : 2544

```

1' ACCCACGCGTCCGATGTGGAGGA
1141' CATCGTCGAGGTACCCGCTCCATCACAAGCACAACTACCTGGTCTCGACGTCGACGA
24' CATCCCCCGCGTCATACAGGAAGCCTTCTTCTCGCGTCTCGGGCCGTCCTGGCCCGGT
1201' CATCCCCCGCGTCGTGAGGAGGCTTCTTCTCGCATCTCTGGTGCCTCGGGGCCCGGT
84' GCTGGTCGACATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGCCGTGCCGGTCTGGGACACCTC
1261' GCTTGTGACATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGCCGTGCCGGCTGGGACACGCC
144' GATGAATCTACCAAGGGTACATCGCACGCTGCCCAAGCCACCCGCGACAGAATTGCTTGA
1321' CATGAGTCTGCCTGGGTACATCGCGCGCTTCCCAAGCTCCCGGACTGAATTTCTTGA
204' GCAGGTCTTGGCTGTGGTGGGAGTCACGGCGCCCGA-TCTCTATGTGGTGGTGGCTG
1381' GCAGGTGCTGCTCTTGTGGTGAATCACGGCGCCCTG-TCTTTATGTTGGCGTGGCTG
264' CTCTGCATCTGGTGACGAATTGCGCTGGTTTGTGAGC-TGACTGGTATCCAGTTACAAC
1441' TGCAGCATCAGGTGAGGAGTTGTGCCGCTTGTGGAGT-TGACTGGAATCCAGTCACAAC
324' CACTCTGATGGGCCTCGGCAATTTCCCAAGTGACGACCCGTTGTCCCTGCGCATGCTTGG
1501' TACTCTTATGGGCTTGGCAACTTCCCAAGCGACGACCCACTGTCACTGCGCATGCTTGG
384' GATGATGGCAGCGGTGTACGCAATTATGCCGTGGATAAGGCTGACCTGTTGCTTGGCTT
1561' TATCATGGCAGAGTGATGCAATTATGCAGTGGATAAGGCCGATCTGTTGCTTGCAAT
444' TGGTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCCAA
1621' TGGTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGAGCTAA
504' GATTGTGCACATTGACATTGATCCAGCAGAGATTGGAAGAACAAAGCAACCACATGTGTC
1681' GATTGTGCACATTGATATTGATCCTGCTGAGATTGGCAAGAACAAAGCAGCCACATGTGTC
564' AATTGTGCGAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTACAACAGAGCAC
1741' CATCTGTGCGAGATGTTAAGCTTGCTTTGACAGGGCATGAATACTCTTCTGGAAGGAAGCAC
624' AACAAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGATGGCACAATGAGTTGGACCAGCAGAGAGGGA
1801' ATCAAAGAAGAGCTTTGACTTCGGCTCATGGCATGATGAATTGGATCAGCAAAGAGGGGA
684' GTTTCCTCTGGGGTACAAACTTTTGGTGAAGAGATCCACCGCAATATGCCATTACAGGT
1861' GTTTCCTCTGGGATATAAATCTTCAATGAGGAAATCCAGCCACAATATGCTATTACAGGT
744' GCTGATGAGCTGACGAAAGGTGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGGAGCAGCAGAT
1921' TCTTGATGAGTTGACGAAAGGGGAGGCCATCATTGCCACAGGTGTTGGGAGCAGCAGAT
804' GTGGGCGGCACAATATTACACTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTGGCTGGTCT
1981' GTGGGCGGCACAGTATTACACTACAAGCGGCCAAGGAGTGGCTGTCTTCACTGGTCT
864' GGGCGCAATGGGATTGGGCTGCTGCTGAGCTGGTGTCTGTGGC-IAACCAAGGIGI
2041' TGGGCTATGGGATTGGTTTGCCTGGCTGCTGCTGGTGTGCTGTGGCCAACCCAGGTGT
924' CACAGTTGTTGATATTGATGGGATGGTAGCTTCCTCATGAACATTAGGAGCTGGCATT

```



## 【図 18 B】

2101" CACTGTTGTTGACATCGACGGAGATGGTAGCTTCCTCATGAACATTCAGGAGCTAGCTAT  
984' GATCCGCATTGAGAACCTCCCTGTGAAGGTGATGGTGTGAACAACCAACATTTGGGTAT  
\*\*\*\*\*  
2161" GATCCGTATTGAGAACCTCCAGTCAAGGTCTTTGTGCTAAACAACCAGCACCTCGGGAT  
1044' GGTGGTGCAATGGGAGGATAGGTTTTACAAGGCGAATAGGGCGCATACATACTTGGGCAA  
\*\*\*\*\*  
2221" GGTGGTGCAGTGGGAGGACAGTTCTATAAGGCCAATAGAGCACACACATTCTTGGGAAA  
1104' CCCGGAATGTGAGAGCGAGATATATCCAGATTTTGTGACCTATTGCTAAGGGGTTCAATA  
\*\*\* \*\*  
2281" CCCAGAGAACGAAAGTGAGATATATCCAGATTTTGTG-GCAATTGCTAAAGGGTTCAACA  
1164' TTCCTGCAGTCCGTGTAACAAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAGAAGATGCTCG  
\*\*\*\*  
2340" TTCCAGCAGTCCGTGTGACAAAGAAGAGCGAAGTCCATGCAGCAATCAAGAAGATGCTTG  
1224' AGACTCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCCGCACCAGGAGCATGTGCTGCCTA  
\*\*  
2400" AGGCTCCAGGGCCGTACCTCTTGGATATAATCGTCCCGCACCAGGAGCATGTGTTGCCTA  
1284' TGATCCCAAGTGGGGGCGCATTCAAGGACATGATCCTGGATGGTGTGGCAGGACTGTGT  
\*\*\*\*\*  
2460" TGATCCCTAGTGGTGGGGCTTTCAAGGATATGATCCTGGATGGTGTGGCAGGACTGTGT  
1344' ATTAATCTATAATCTGTATGTTGGCAAAGCACCAGCCCGGCTATGTTTGACCTGAATGA  
\*\*\* \*\*  
2520" ATTGATCCGTTGACTGCAGGTCGAC

【図 19 A】

### 1st Nucleotide Sequence

File Name : 2点変異型完全長ALS cDNA

2nd Nucleotide Sequence

File Name : 野性型完全長 ALS cDNA

1' CTCGCCGCCGCCGCCGCCGCCACCACCCACCATGGCTACGACCG  
1" CCCAAACCAGAAACCTCTGCCGCCGCCGCCGCCGCCACCCACCATGGCTACGACCG  
45' CCGCGGCCCGCGGCCGCCGCCCTGTCTGCCGCCGCCGACGGCCAAAGACCGGCCGTAAGAACC  
61" CCGCGGCCCGCGGCCGCCGCCCTGTCTGCCGCCGCCGACGGCCAAAGACCGGCCGTAAGAACC  
105' ACCAGCGACACCACGTCTTCCGCTCGAGGCCGGTGGGGCGGCCGCTCAGGTGCT  
121" ACCAGCGACACCACGTCTTCCGCTCGAGGCCGGTGGGGCGGCCGCTCAGGTGCT  
165' CGCGGTTGTCCTCCGGTCACCCGCCGTCCTCCGGCGCCGCCGCCACGCCGCTCCGGCCGT  
181" CGCGGTTGTCCTCCGGTCACCCGCCGTCCTCCGGCGCCGCCGCCACGCCGCTCCGGCGCT  
225' GGGGGCCCGCCGAGCCCCGCAAGGGCGCGGACATCTCTGTGGAGGCGCTGGAAGCGGTGCG  
241" GGGGGCCCGCCGAGCCCCGCAAGGGCGCGGACATCTCTGTGGAGGCGCTGGAAGCGGTGCG  
285' GCGTCAGCGACGTGTTGCGCTACCCGGGCGCGCGTCCATGGAGATCCACGAGGCGCTGA  
301" GCGTCAGCGACGTGTTGCGCTACCCGGGCGCGCGTCCATGGAGATCCACGAGGCGCTGA  
345' CGCGCTCCCCGGTCATACCAACCACCTCTTCCGCCACGAGCAGGGCGAGGCGTTCTCGCG  
361" CGCGCTCCCCGGTCATACCAACCACCTCTTCCGCCACGAGCAGGGCGAGGCGTTCTCGCG  
405' CGTCCGGGTACGCGCGCGCGTCTCGGCCGCGCTCGGGCTGCTCGCTGCCACCTCTCGGCCCG  
421" CGTCCGGGTACGCGCGCGCGTCTCGGCCGCGCTCGGGGTGCTCGCTGCCACCTCTCGGCCCG  
465' GGGCAACCAACCTCGTGTCCGCGCTCGCCGACCGCGTCTCGACTCCGTCCTCCGATGGTGC  
481" GGGCAACCAACCTCGTGTCCGCGCTCGCCGACCGCGTCTCGACTCCGTCCTCCGATGGTGC  
525' CCATCACGGGCCAGGTCCCCCGCCGCATGATGGCACCGACCGCTTCCAGGAGACGCCCA  
541" CCATCACGGGCCAGGTCCCCCGCCGCATGATGGCACCGACCGCTTCCAGGAGACGCCCA  
585' TAGTCGAGGTACCCGCTCCATACCAAGCACAAATTACCTTGTCTTGATGTGGAGGACA  
601" TAGTCGAGGTACCCGCTCCATACCAAGCACAAATTACCTTGTCTTGATGTGGAGGACA  
645' TCCCCCGCGTCATACAGGAAGCCTTCTCTCGCGTCTCGGGCGTCTGGCCCGGTGCG  
661" TCCCCCGCGTCATACAGGAAGCCTTCTCTCGCGTCTCGGGCGTCTGGCCCGGTGCG  
705' TGGTGACATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCCGTGCCGCTTGGGACACCTCGA  
721" TGGTGACATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCCGTGCCGCTTGGGACACCTCGA  
765' TGAATCTACCAGGGTACATCGCACGCCTGCCCAAGCCACCCGCCGACAGAATTGCTTGAGC  
781" TGAATCTACCAGGGTACATCGCACGCCTGCCCAAGCCACCCGCCGACAGAATTGCTTGAGC  
825' AGGCTCTGCGTCTGGTGGCGAGTACCGCGCCCGATTCTCTATGTCGGTGGTGGCTGCT  
841" AGGCTCTGCGTCTGGTGGCGAGTACCGCGCCCGATTCTCTATGTCGGTGGTGGCTGCT  
885' CTGCATCTGGTGACGAATTGCGCTGGTTTGTTCAGCTGACTGGTATCCAGTTACAACCA  
901" CTGCATCTGGTGACGAATTGCGCTGGTTTGTTCAGCTGACTGGTATCCAGTTACAACCA  
945' CTCTGATGGGCTCTGGCAATTCTCCCAAGTACGACCCGTTGCTCTGCGCATGCTTGGGA  
961" CTCTGATGGGCTCTGGCAATTCTCCCAAGTACGACCCGTTGCTCTGCGCATGCTTGGGA  
1005' TGCATGGCACGGTACGCAAAATTATGCGGTGGATAGGCTGACCTGTTGCTTGGCTTTG

【図 19 B】

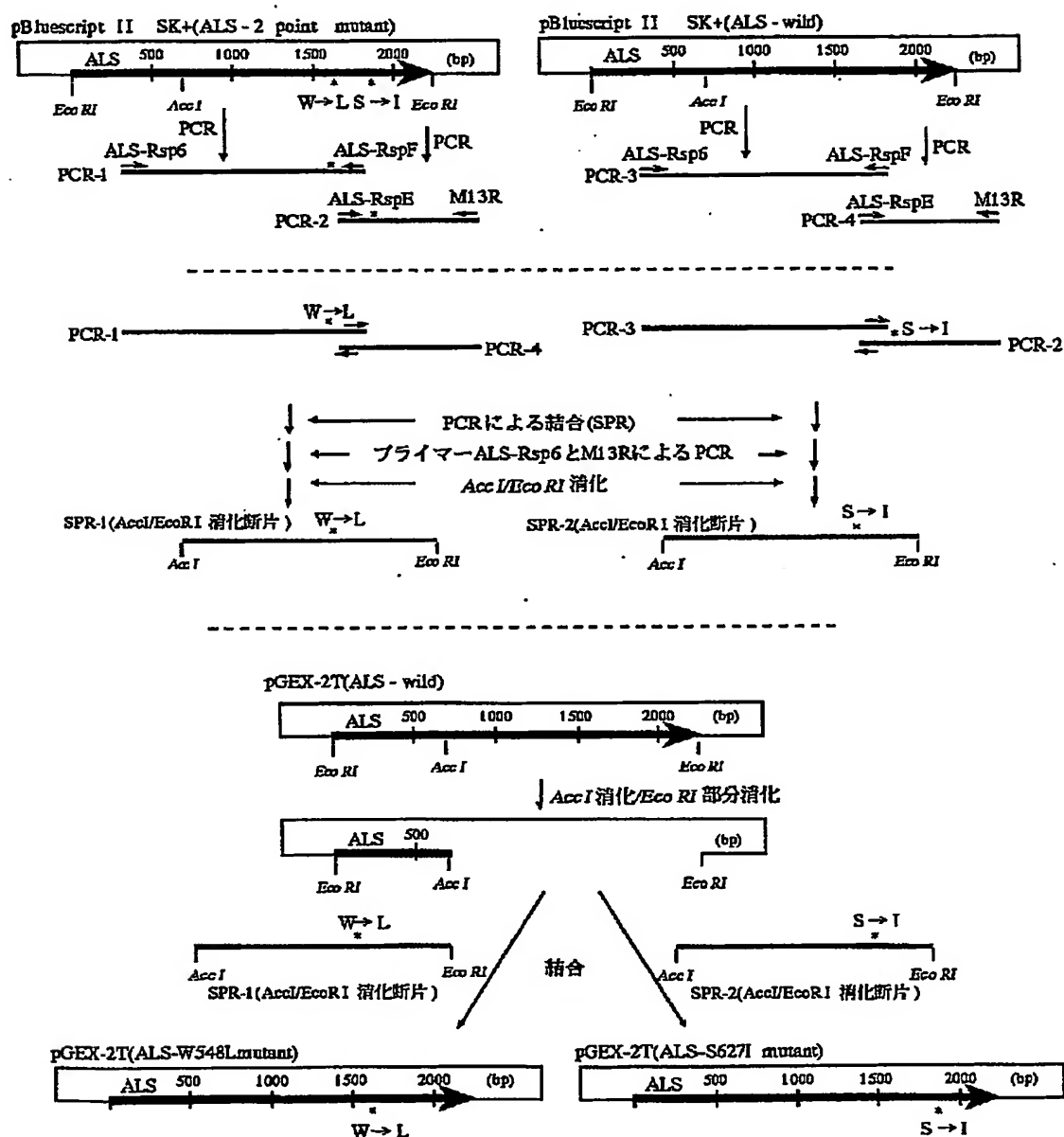
\*\*\*\*\*  
1021' TGCATGGCACGGGTGACGCAAAATTATGCCGTGGATAAGGCTGACCTGTTGCTTGCCTTTG  
1065' GTGTGCGGTTTGTATGATCGTGTGACAGGGAAAAATTGAGGCTTTTGAAGCAGGGCCAAGA  
\*\*\*\*\*  
1081' GTGTGCGGTTTGTATGATCGTGTGACAGGGAAAAATTGAGGCTTTTGAAGCAGGGCCAAGA  
1125' TTGTGCACATTGACATTGATCCAGCAGAGATTGGAAAGAACAGCAACCACATGTGTCAA  
\*\*\*\*\*  
1141' TTGTGCACATTGACATTGATCCAGCAGAGATTGGAAAGAACAGCAACCACATGTGTCAA  
1185' TTTGCGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTACAACAGAGCACAA  
\*\*\*\*\*  
1201' TTTGCGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTACAACAGAGCACAA  
1245' CAAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGATGGCACAATGAGTTGGACCAGCAGAGAGGGAGT  
\*\*\*\*\*  
1261' CAAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGATGGCACAATGAGTTGGACCAGCAGAGAGGGAGT  
1305' TTCTCTGCGGTACAAAACCTTTTGGTGAAGAGATCCACCGCAATATGCCATTCAEGTGC  
\*\*\*\*\*  
1321' TTCTCTGCGGTACAAAACCTTTTGGTGAAGAGATCCACCGCAATATGCCATTCAEGTGC  
1365' TGGATGAGCTGACGAAAGGTGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGGCAGCACCAGATGT  
\*\*\*\*\*  
1381' TGGATGAGCTGACGAAAGGTGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGGCAGCACCAGATGT  
1425' GGGCGGCACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTGGCTGGTCTGG  
\*\*\*\*\*  
1441' GGGCGGCACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTGGCTGGTCTGG  
1485' GCGCAATGGGATTTGGGCTGCTGCTGAGCTGGTGTCTTGGCTAACCCAGGTGTCA  
\*\*\*\*\*  
1501' GCGCAATGGGATTTGGGCTGCTGCTGAGCTGGTGTCTTGGCTAACCCAGGTGTCA  
1545' CAGTTGTTGATATTGATGGGATGGTAGCTTCTCATGAACATTAGGAGCTGGCATTGA  
\*\*\*\*\*  
1561' CAGTTGTTGATATTGATGGGATGGTAGCTTCTCATGAACATTAGGAGCTGGCATTGA  
1605' TCCGCATTGAGAACCCTCCCTGTGAAGGTGATGGTGTGAACAACCAACATTGGGTATGG  
\*\*\*\*\*  
1621' TCCGCATTGAGAACCCTCCCTGTGAAGGTGATGGTGTGAACAACCAACATTGGGTATGG  
1665' TGGTGCAATTGGAGGATAGGTTTTACAAGGCGAATAGGGCGCATACATACTGGGCAACC  
\*\*\*\*\*  
1681' TGGTGCAATTGGAGGATAGGTTTTACAAGGCGAATAGGGCGCATACATACTGGGCAACC  
1725' CGGAATGTGAGAGCGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAGGGGTTCAATATTC  
\*\*\*\*\*  
1741' CGGAATGTGAGAGCGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAGGGGTTCAATATTC  
1785' CTGCAGTCCGTGTAACAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAGAAGATGCTCGAGA  
\*\*\*\*\*  
1801' CTGCAGTCCGTGTAACAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAGAAGATGCTCGAGA  
1845' CTCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCTCCCGCACCAGGAGCATGTGCTGCCTATGA  
\*\*\*\*\*  
1861' CTCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCTCCCGCACCAGGAGCATGTGCTGCCTATGA  
1905' TCCCAATTGGGGGCGCATTCAAGGACATGATCTGGATGGTGTGGCAGGACTGTGTATT  
\*\*\*\*\*  
1921' TCCCAAGTGGGGGCGCATTCAAGGACATGATCTGGATGGTGTGGCAGGACTGTGTATT  
1965' AATCTATAATCTGTATGTTGGCAAAGCACCAGCCCGGCTATGTTTGACCTGAATGACCC  
\*\*\*\*\*  
1981' AATCTATAATCTGTATGTTGGCAAAGCACCAGCCCGGCTATGTTTGACCTGAATGACCC  
2025' ATAAAGAGTGGTATGCCTATGATGTTGTATGTGCTCTATCAATAACTAAGGTGTCAACT  
\*\*\*\*\*  
2041' ATAAAGAGTGGTATGCCTATGATGTTGTATGTGCTCTATCAATAACTAAGGTGTCAACT  
2085' ATGAACCAATGCTCTTCTGTTTTACTTGTGTTGATGTGCTTGGCATGGTAATCCTAATTA  
\*\*\*\*\*  
2101' ATGAACCAATGCTCTTCTGTTTTACTTGTGTTGATGTGCTTGGCATGGTAATCCTAATTA  
2145' GCTTCTGCTGTCTAGGTTTGTAGTGTGTTGTTTTCTGTAGGCATATGCATCACAAGATA

【図 19 C】

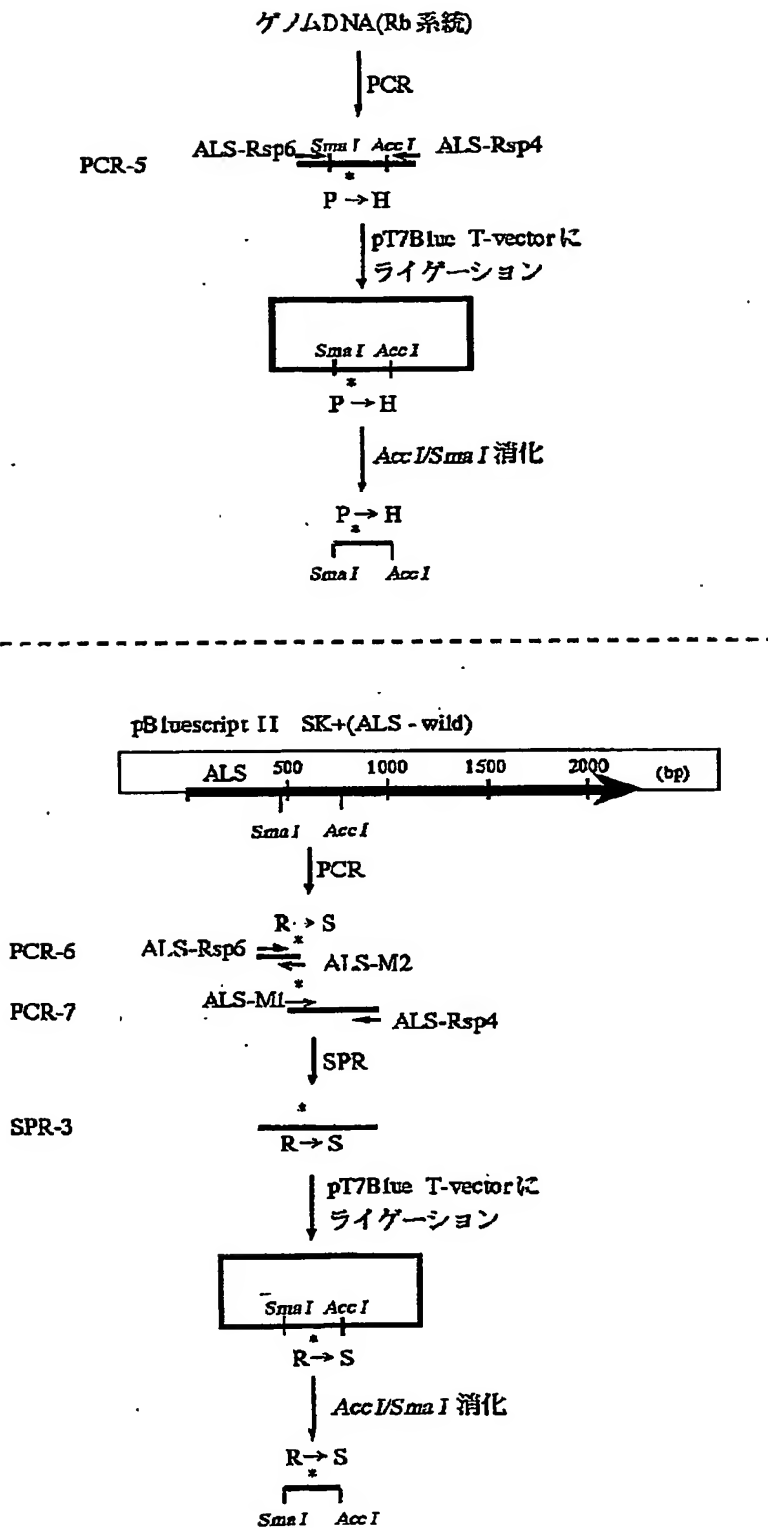
```

*****
2161" GCTTCCTGCTGTCTAGGTTTGTAGTGTGTTTCTGTAGGCATATGCATCACAAGATA
2205' TCATGTAAGTTTCTTGTCTACATATCAATAATAAGAGAATAAAGTACTTCTATGTA AAA
*****
2221" TCATGTAAGTTTCTTGTCTACATATCAATAATAAGAGAATAAAGTACTTCTATGCAAAA
2265' AAAAAAAAAAAAAAAAAA
*****
2281" AAAAAAAAAAAAAAAAAA
  
```

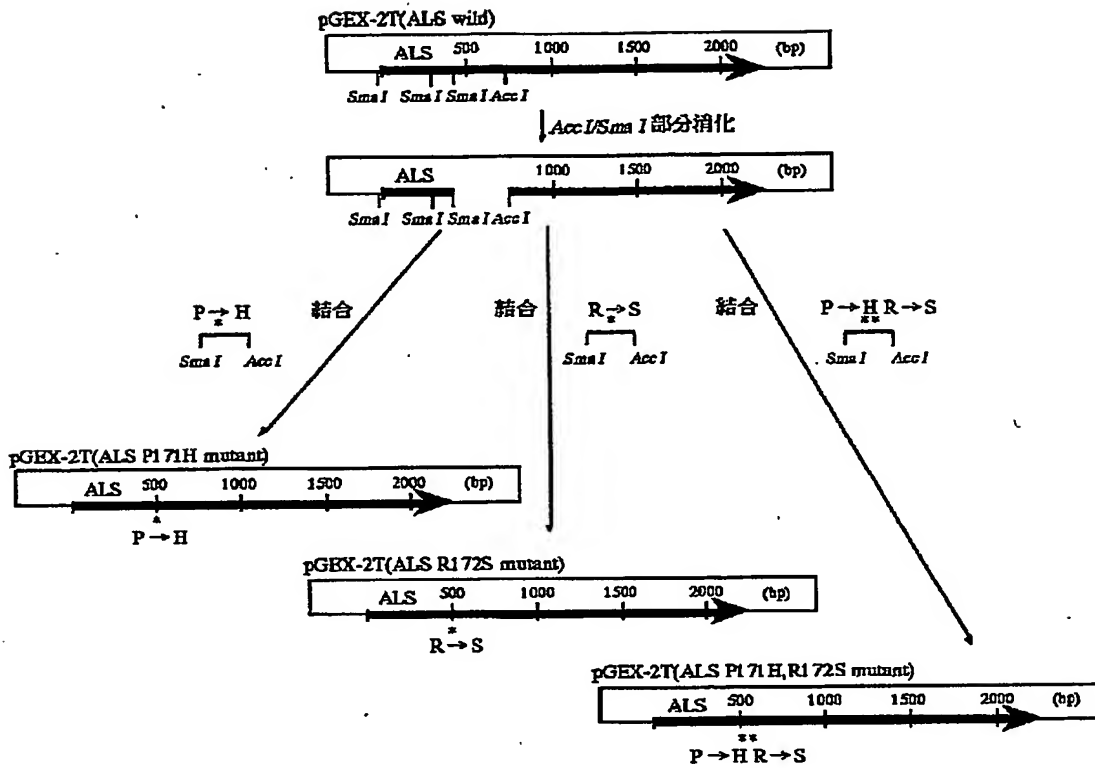
【図 20】



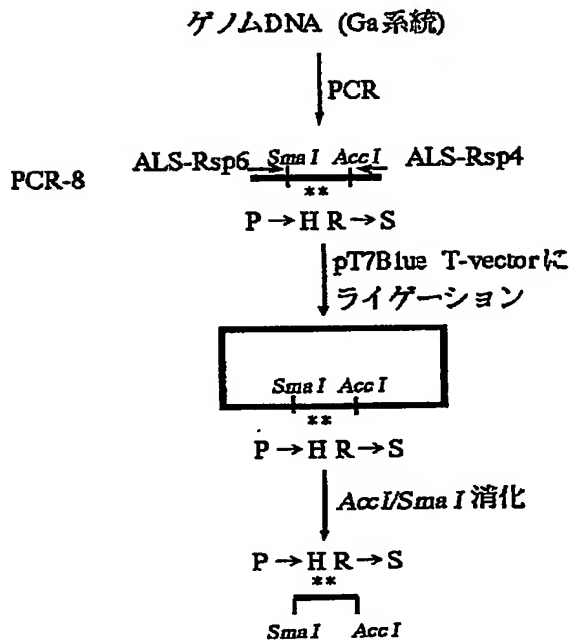
【図 21】



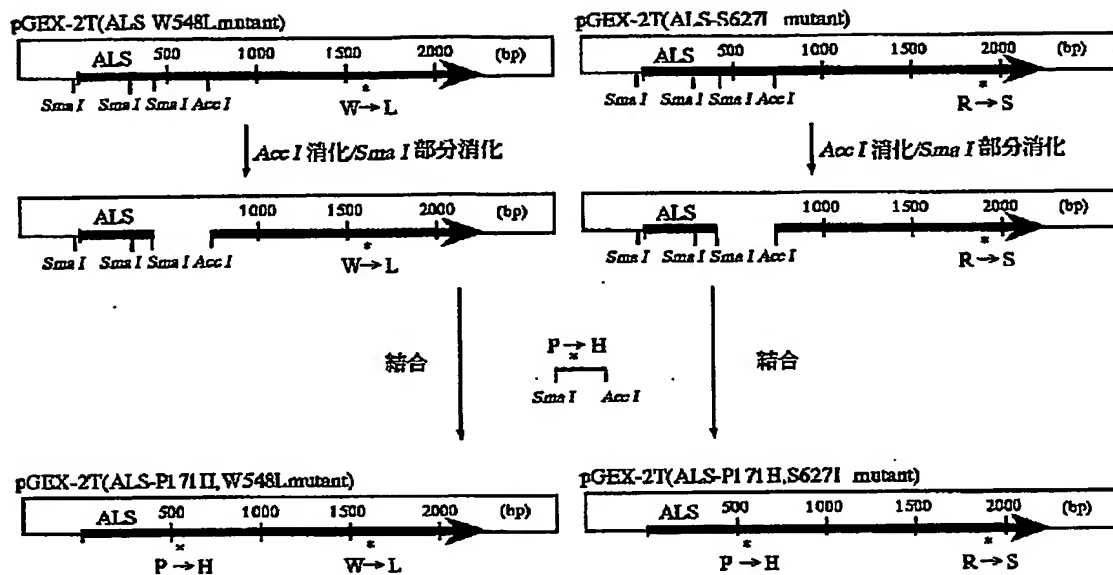
【図 2 2】



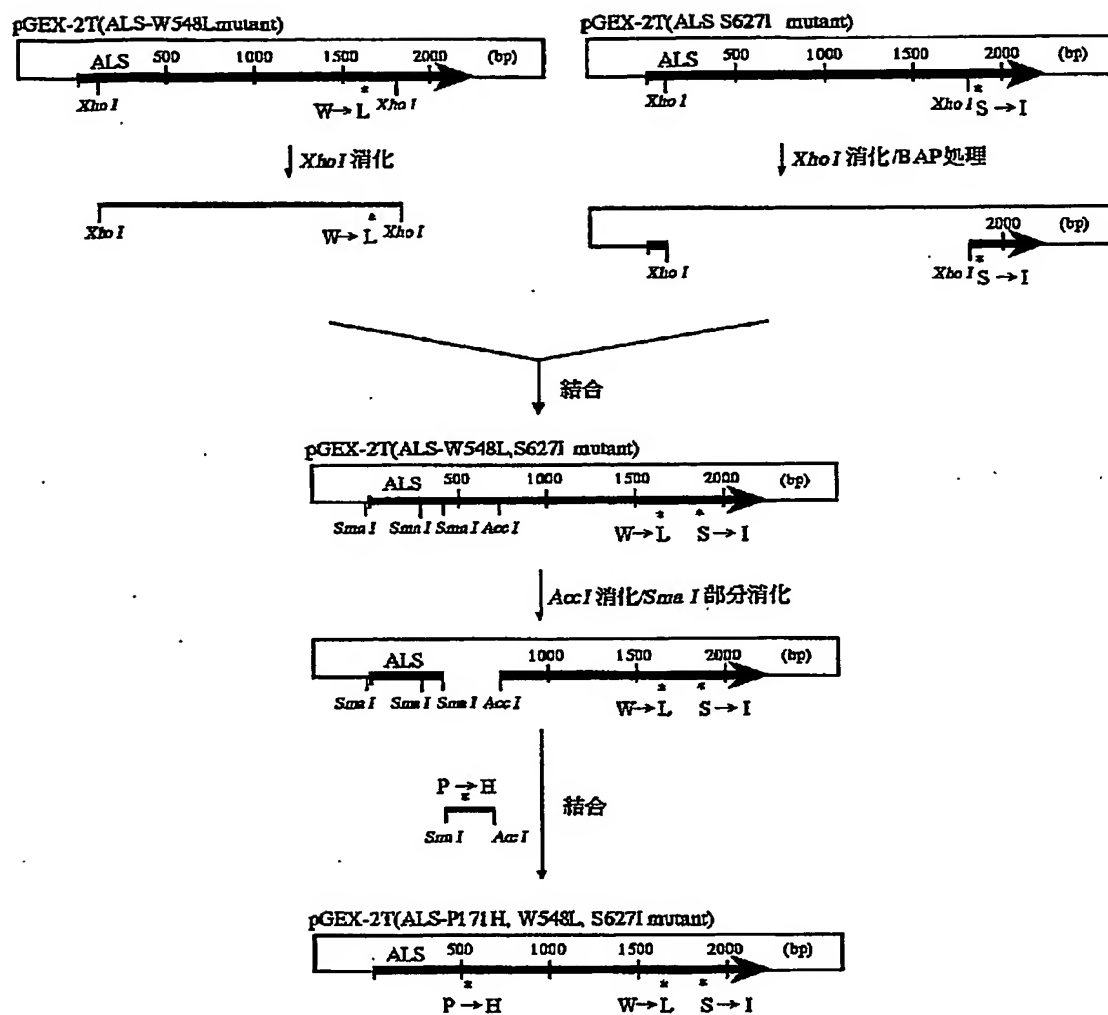
【図 2 3】



【図 24】

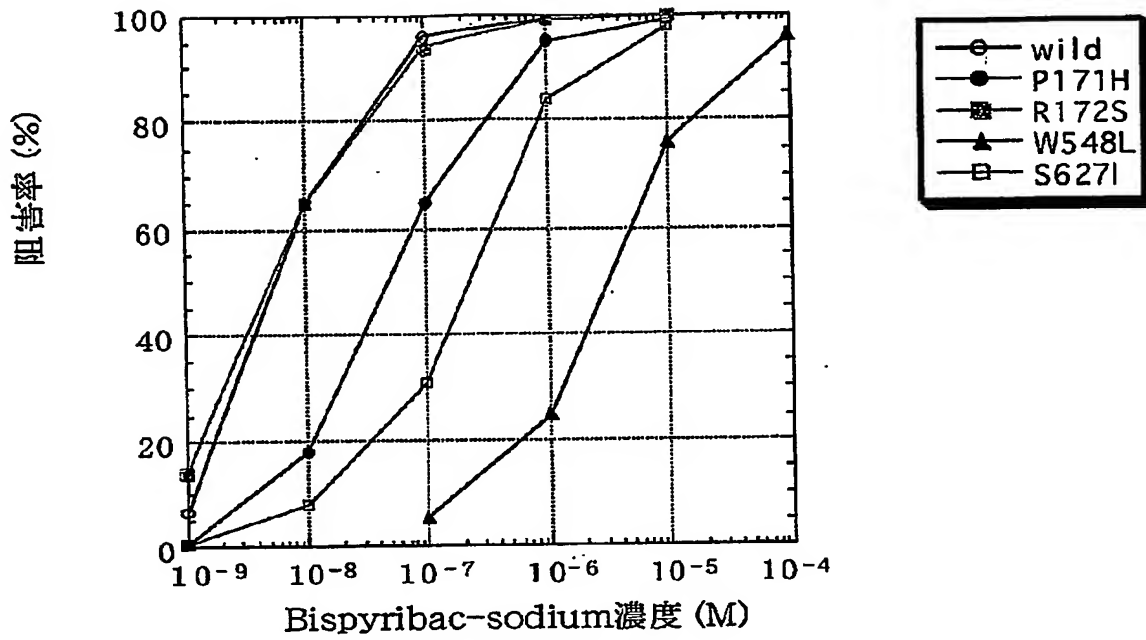


【図 25】

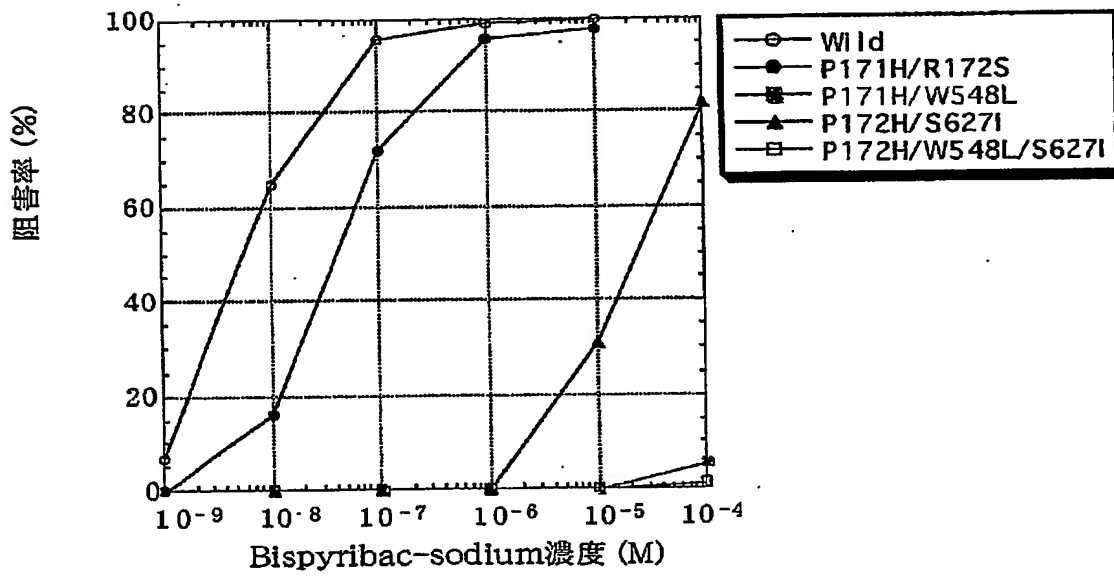




【図26】



【図27】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 PC系除草剤或いはスルホニルウレア系除草剤に対して高度な抵抗性を示す。

【解決手段】 以下の（a）又は（b）のタンパク質をコードする遺伝子である。

（a）配列番号 2，4，6 および 8 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

（b）配列番号 2，4，6 および 8 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列における少なくとも 1 以上のアミノ酸が置換、欠失、又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、ピリミジニルカルボキシ除草剤に対する抵抗性を有し、アセト乳酸シンターゼ活性を有するタンパク質。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000169]

1. 変更年月日	1990年 8月29日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都台東区池之端1丁目4番26号
氏 名	クミアイ化学工業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [501167644]

1. 変更年月日 2001年 4月24日

[変更理由] 新規登録

住 所 茨城県つくば市観音台2丁目1-2

氏 名 独立行政法人農業生物資源研究所